



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTERISASI FRUKTO-OLIGOSAKARIDA (FOS) DARI
FERMENTASI SUKROSA OLEH *Penicillium notatum***

SKRIPSI

FADIAH SABILA

0706263100

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN KIMIA

DEPOK

JANUARI 2012



UNIVERSITAS INDONESIA

**KARAKTERISASI FRUKTO-OLIGOSAKARIDA (FOS) DARI
FERMENTASI SUKROSA OLEH *Penicillium notatum***

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana

FADIAH SABILA

0706263100

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

DEPARTEMEN KIMIA

DEPOK

JANUARI 2012

HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Nama : Fadiah Sabila

NPM : 0706263100

Tanggal : 6 Januari 2012

Tanda Tangan :



HALAMAN PENGESAHAN

Skripsi ini diajukan oleh :
Nama : Fadiah Sabila
NPM : 0706263100
Program Studi : Kimia S1 Reguler
Judul Skripsi : Karakterisasi Frukto-Oligosakarida (FOS) dari
Fermentasi Sukrosa oleh *Penicillium notatum*

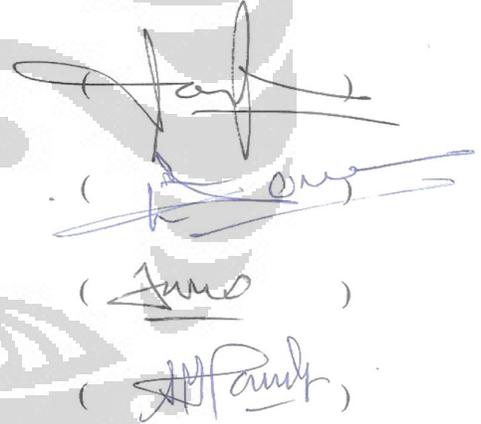
Telah berhasil dipertahankan di hadapan Dewan Penguji dan diterima sebagai bagian persyaratan yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana Sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Indonesia

Pembimbing : Dr. Endang Saepudin

Penguji 1 : Prof. Dr. Soleh Kosela M.Sc.

Penguji 2 : Dr. Jarnuzi

Penguji 3 : Dra. Sri Handayani M.Biomed.



(*[Signature]*)
(*[Signature]*)
(*[Signature]*)
(*[Signature]*)

Ditetapkan di : Depok

Tanggal : 6 Januari 2012

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya milik Allah SWT atas limpahan hidayah, taufik dan keberkahan ilmu kepada penulis, sehingga penulis dapat merampungkan laporan tugas akhir ini dengan baik. Shalawat serta salam senantiasa terlimpah kepada Baginda Muhammad SAW. Penulis menyadari bahwa tanpa bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, dari masa perkuliahan sampai pada penyusunan skripsi ini, sulitlah kiranya bagi penulis untuk menyelesaikan skripsi ini. Maka terima kasih sebesar-besarnya kepada :

1. Dr. Endang Saepudin, yang senantiasa membimbing, mengarahkan, dan mengajarkan banyak hal sehubungan penyelesaian skripsi ini. Atas waktu, tenaga, dan pikiran yang dicurahkan, semoga Allah menggantinya dengan kebaikan yang berlipat.
2. Dr. Riwandi Sihombing, Ph.D yang telah dengan ramahnya menjadi pembimbing akademis selama perkuliahan di kimia.
3. Drs. Ridla Bakri M.Phil, Ph.D, untuk nasihat-nasihatnya selaku ketua Departemen Kimia FMIPA UI.
4. Bu Yani, Prof. Soleh, Pak Jarnuzi, dan seluruh dosen yang telah mendidik dan mengajarkan ilmu-ilmu bermanfaat selama perkuliahan.
5. Umi Wasiah dan Abi Idris yang senantiasa mencurahkan doa dan dukungannya untuk merampungkan skripsi ini. Atas setiap kebaikan, semoga Allah menghadiahkan sebaik-baik balasan.
6. Mba Hani, Fira, Adam, dan Iman untuk motivasi dan doanya yang nampak maupun tersembunyi
7. Babe Sutrisno, Pak Hedi, Pak Amin, Pak Kiri, Mba Ema, Mba Tri, Mba Cucu, Mba Ina dan seluruh staf Departemen Kimia yang telah dengan ramahnya membantu dan memfasilitasi kebutuhan penulis.
8. Ka Zora dan seluruh staf di Laboratorium Afiliasi Departemen Kimia yang telah mengizinkan, mengajarkan, dan membimbing penulis dalam menggunakan HPLC.
9. Teman-teman penelitian lantai 4 dan lab kering: Ardi, Adi, Rasti, Widi, Adli, JE, dan Yogi. Walaupun sering galau tetap penuh semangat.

10. Teman-teman penelitian lantai 3 dan para perantau LIPI-Pertamina: Fitriana, Wahyu, Yuliga, Putri, Rosa, Mita, Nenci, Savit, Silvi, Ikor, Rafi, Rohman, Hesti, Yomi, Tyo, Atur, Riri, Harmesa, Umar, Ochi, Vivi, Sania, Ocha, Ka Narita, Ka Sonia, Ka Reka, Ka Habibah.
11. Teman-teman S1 reguler 2007 yang selalu memberikan dukungan moril dan spiritual, serta banyak informasi berharga kepada penulis.
12. Kawan-kawan yang telah lebih dulu meninggalkan kimia dan tanpa henti membantu dan mengarahkan penulis : Rifan, Ka Emil, Ka Hogan, Iqi, Sherly, Ka Desi, Ka Linda, Ka Nany, Ka Nita.
13. Adik-adikku pengalir semangat di Kimia : Andi Astri, Reza, Eka, Intan, Michu, Sarah, Lia, Yuli, Narti, Rina, Mona.
14. Saudara-saudari Bintang Kecilku yang telah memberi kebersamaan dan kehangatan di FMIPA UI. Semoga semua yang telah ada tak kan lekang dimakan waktu.
15. Eka Desi Lestari yang telah dengan sabarnya menuntun dan mengajarkan seputar Mikrobiologi selama penelitian ini.
16. Kawan-kawan terbaik, Meli, Misda, Rani yang menawarkan persahabatan paling indah dan tulus, yang mendoakan dalam diam, dan yang memperhatikan tanpa diminta.
17. Sahabat ter-oke, teman sejati, kawan seperjuangan yang telah dengan ikhlasnya menemani perjuangan dan mewarnai kehidupan penulis selama di kimia, Widya Puspita Sari.
18. Seseorang yang dengan tulus dan setianya menemani, menyemangati, dan membantu penulis selama penelitian dan penulisan skripsi ini, semoga kita senantiasa menggenggam kebahagiaan yang diridhoi-Nya.
19. Semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.

Semoga Allah memberikan balasan terbaik atas kebaikan kalian. Semoga skripsi ini membawa kebermanfaatan.

Depok, Januari 2012

Penulis

**HALAMAN PERNYATAAN PERSETUJUAN PUBLIKASI TUGAS
AKHIR UNTUK KEPENTINGAN AKADEMIS**

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

Nama : Fadiah Sabila
NPM : 0706263100
Program Studi : S1
Departemen : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Jenis karya : Skripsi

Demi pengembangan ilmu pengetahuan, menyetujui untuk memberikan kepada Universitas Indonesia **Hak Bebas Royalti Noneksklusif (*Non-exclusive Royalty-Free Right*)** atas skripsi saya yang berjudul : Karakterisasi Frukto-Oligosakarida (FOS) Dari Fermentasi Sukrosa oleh *Penicillium notatum*, beserta 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 : 6 Januari 2012

Yang menyatakan



(Fadiah Sabila)

ABSTRAK

Nama : Fadiah Sabila
Program Studi : Kimia
Judul : Karakterisasi Frukto-Oligosakarida (FOS) dari Fermentasi Sukrosa oleh *Penicillium notatum*

Frukto-oligosakarida (FOS) merupakan suatu oligosakarida yang memiliki fungsi prebiotik dan dapat dimanfaatkan dalam bidang kesehatan. *Penicillium notatum* merupakan mikroorganisme jenis kapang yang diketahui memiliki kemampuan untuk mensintesis senyawa FOS. Dalam penelitian ini dilakukan fermentasi cair dengan menggunakan sukrosa 20% sebagai substrat dalam pembentukan FOS. Fermentasi dilakukan selama 7 hari. Selama fermentasi berlangsung jumlah sukrosa, fruktosa, glukosa, dan FOS diamati dan dianalisis dengan HPLC. Hasil analisis menunjukkan bahwa jumlah sukrosa menurun seiring berjalannya waktu diikuti dengan meningkatnya jumlah glukosa dan FOS. Jumlah optimum FOS, diperoleh pada waktu fermentasi antara 70-75 jam. Komponen dari FOS dianalisis dengan menghidrolisis FOS murni yang telah diisolasi. Hasil menunjukkan bahwa FOS terdiri dari glukosa dan fruktosa.

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

xiv + 41 halaman; 19 gambar; 5 tabel; 6 lampiran
Daftar Pustaka: 28 (1965-2011)

ABSTRACT

Name : Fadiah Sabila
Program Study : Chemistry
Title : Characterization of Fructo-Oligosaccharide (FOS) from
Fermentation of Sucrose by *Penicillium notatum*

Fructo-oligosaccharides (FOS) is an oligosaccharide which has a function as prebiotic and can be used as health food. *Penicillium notatum* is fungi which is known to have the ability to synthesize FOS. In this study, liquid fermentation of 20% sucrose was used as substrate. Fermentation was carried out for 7 days. During the fermentation, the amount of sucrose, fructose, glucose, and FOS were observed by HPLC analysis. The analysis showed that the concentration of sucrose reduced whereas the concentration of glucose and FOS increased. The optimum amount of FOS was obtained between 70-75 hours. The component of FOS was analyzed by hydrolyzed from isolated FOS with 1M HCl. The results show that FOS consist of glucose and fructose.

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

xiv + 41 pages; 19 pictures; 5 tables; 6 attachments
bibliography: 28 (1965-2011)

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	ii
HALAMAN PERNYATAAN.....	iii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iv
KATA PENGANTAR	v
HALAMAN PUBLIKASI KARYA ILMIAH	vii
ABSTRAK	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiv
BAB I. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	5
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Prebiotik dan Probiotik	6
2.2 Fruktu-oligosakarida.....	8
2.3 Transfruktosilasi.....	12
2.4 <i>Penicillium notatum</i>	15
2.5 HPLC	18
BAB III. METODELOGI PENELITIAN	
3.1 Alat dan Bahan	19
3.1.1 Alat yang digunakan	19
3.1.2 Bahan Kimia yang digunakan	19
3.1.3 Mikroorganisme yang digunakan	19
3.2 Prosedur Kerja.....	23
3.2.1 Sterilisasi Alat	23
3.2.2 Pembuatan Larutan Standar	23
3.2.3 Persiapan Mikroorganisme	24
3.2.4 Penentuan Jumlah Sel Mikroba.....	24
3.2.5 Fermentasi	25
3.2.6 Analisis Awal Produk Fermentasi	25
3.2.7 Identifikasi Senyawa FOS.....	26

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	28
4.2 Penentuan Kurva Standard.....	28
4.3 Persiapan Mikroorganisme	30
4.4 Penentuan Jumlah Sel Mikroba.....	31
4.5 Fermentasi Sukrosa	32
4.6 Penentuan Kurva Produksi FOS.....	33
4.7 Identifikasi Produk FOS	36

BAB V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran	38

DAFTAR PUSTAKA	39
----------------------	----

LAMPIRAN	42
----------------	----

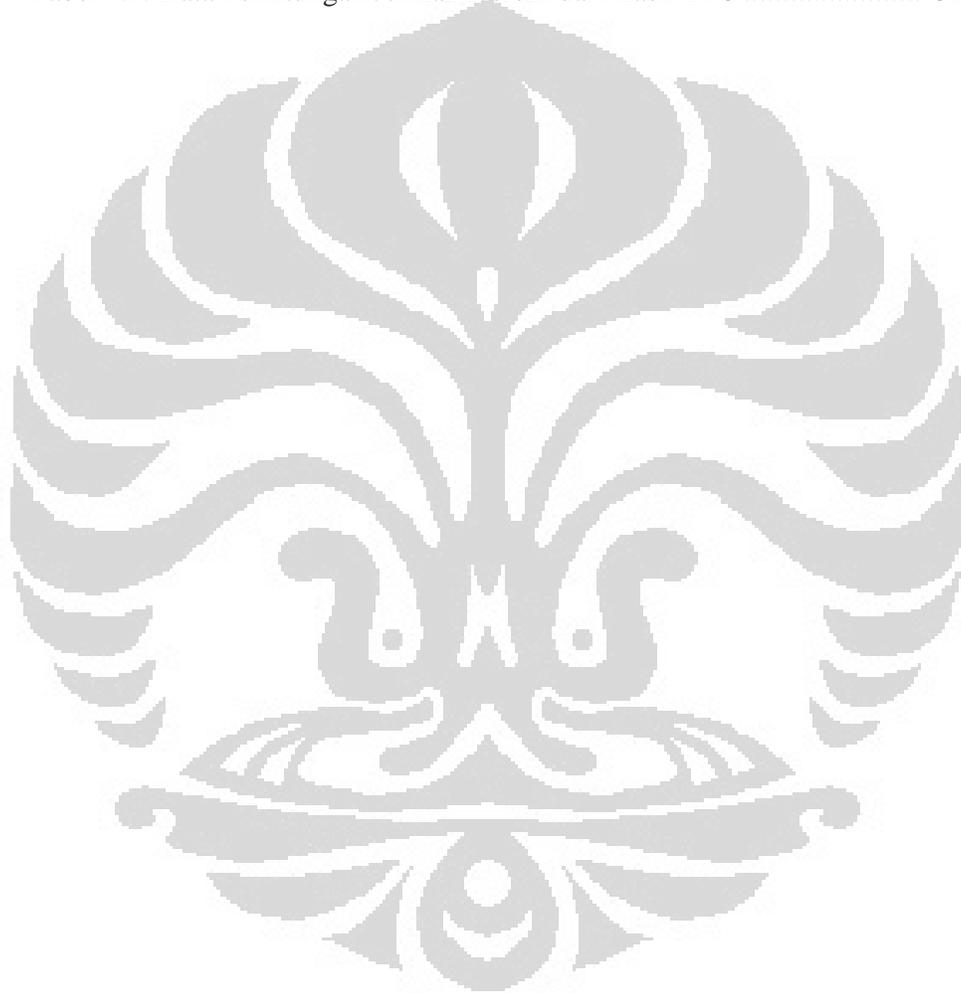


DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1. Struktur Umum Frukto-Oligosakarida.....	8
Gambar 2.2. Jenis-Jenis Senyawa Frukto-Oligosakarida.....	10
Gambar 2.3. Jaring-Jaring Mekanisme Reaksi Sintesis FOS	14
Gambar 2.4. Morfologi <i>Penicillium notatum</i>	15
Gambar 2.5. Struktur <i>Penicillium</i>	16
Gambar 2.6. Kurva Pertumbuhan <i>Penicillium notatum</i>	17
Gambar 2.7. Skema Umum Perangkat HPLC.....	18
Gambar 3.1. Diagram Umum Alur Kerja Penelitian	20
Gambar 3.2. Skema Kerja Fermentasi	21
Gambar 3.3. Skema Alur Kerja Isolasi Dan Pemurnian Produksi FOS	22
Gambar 4.1. Kromatogram Larutan Standar	29
Gambar 4.2. <i>Penicillium notatum</i> dalam Medium PDA Agar Miring.....	30
Gambar 4.3. Hasil TPC <i>Penicillium notatum</i>	31
Gambar 4.4. Foto Hasil Fermentasi Sukrosa dengan <i>Penicillium notatum</i> ..	32
Gambar 4.5. Reaksi Umum Pembentukan FOS dengan enzim.....	33
Gambar 4.6. Kurva Konsumsi Sukrosa Dan Produksi Glukosa, Fruktosa, dan FOS Selama Fermentasi.....	35
Gambar 4.7. Foto Produk FOS setelah diisolasi.....	36
Gambar 4.8. Kromatogram Isolasi Produk FOS	37
Gambar 4.9. Kromatogram Dari Isolat Produk FOS yang Dihidrolisis.....	37

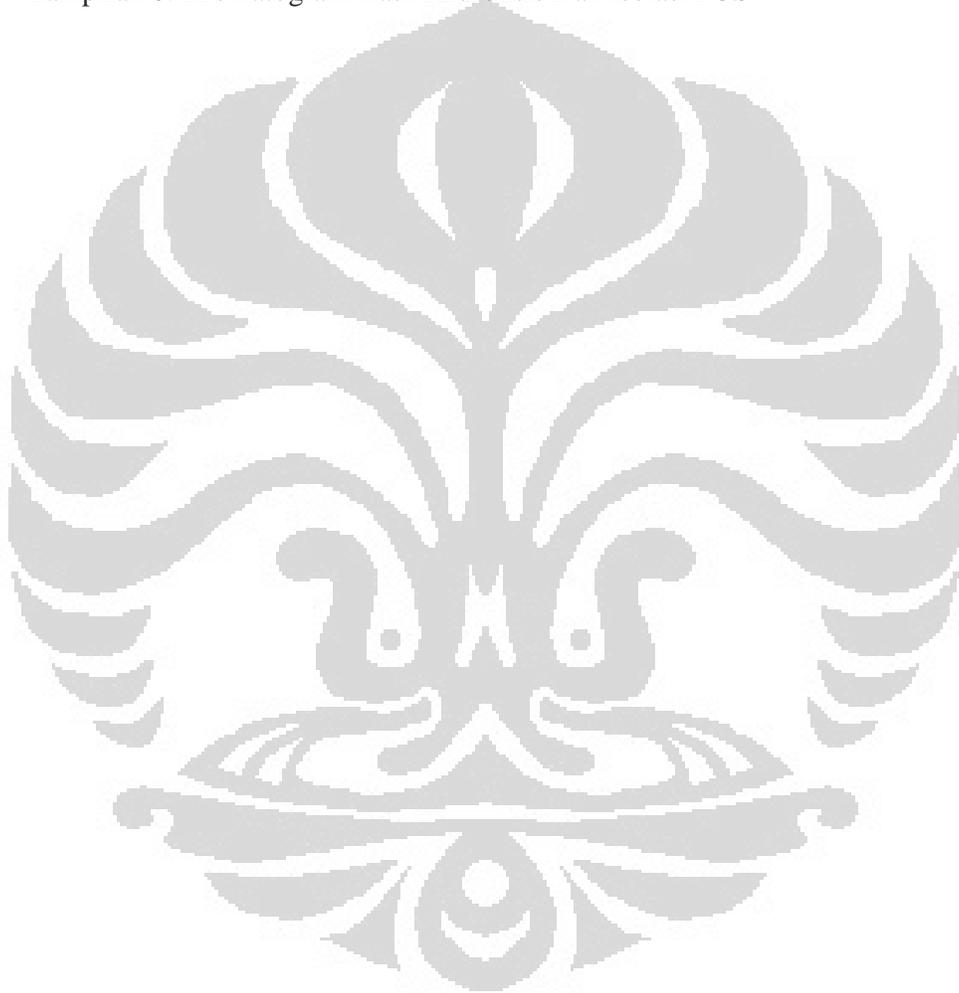
DAFTAR TABEL

Tabel 2.1. Kandungan FOS Dalam Beberapa Jenis Tanaman	11
Tabel 2.2. Perlakuan FOS Dalam Sistem Pencernaan	12
Tabel 2.3. Beberapa Mikroorganisme,Enzim,dan Kondisi Optimal Untuk Menghasilkan FOS	13
Tabel 2.4. Klasifikasi <i>Penicillium notatum</i>	16
Tabel 4.1. Data Perhitungan Jumlah Koloni dari Hasil TPC	31



DAFTAR LAMPIRAN

- Lampiran 1. Kromatogram Larutan Standar Sukrosa
- Lampiran 2. Kromatogram Larutan Standar Glukosa
- Lampiran 3. Kromatogram Larutan Standar FOS
- Lampiran 4. Kromatogram Larutan Sukrosa, Glukosa, dan FOS
- Lampiran 5. Kromatogram Hasil Fermentasi Sukrosa 20%
- Lampiran 6. Kromatogram Hasil Hidrolisis Dan Isolasi FOS



BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Di awal kehidupan, setelah kelahirannya di dunia, hal yang pertama kali dikonsumsi oleh bayi normal adalah air susu ibu (ASI). Umumnya setiap bayi belum memiliki sistem kekebalan tubuh yang kompleks seperti manusia dewasa sehingga sang bayi rentan terkena penyakit. Selain sangat kaya akan zat gizi dan mudah dicerna sistem pencernaan bayi yang masih rentan, ASI mampu melindungi bayi dari serangan penyakit sistem pernapasan dan pencernaan. Hal itu disebabkan adanya zat-zat yang terkandung di dalam ASI mampu memberikan perlindungan langsung melawan serangan penyakit (Yahya, 2005)

Karbohidrat termasuk salah satu zat yang terkandung dalam ASI. Berbagai jenis oligosakarida dari karbohidrat dalam ASI memiliki peran besar dalam sistem kekebalan pada tubuh bayi. Jenis senyawa tersebut membantu penyerapan kalsium dan mempertahankan faktor libidus di dalam usus, faktor yang menghambat pertumbuhan bakteri patogen dan menjadikan tempat yang baik bagi bakteri baik (Murniasih, 2010).

Komposisi oligosakarida pada bayi ini sangat kompleks, sehingga sulit untuk mendeteksi oligosakarida mana yang paling berperan dalam sistem imunitas bayi. Salah satu jenis oligosakarida yang terkenal dan terkandung dalam ASI adalah Frukto-oligosakarida (FOS) dan Galakto-oligosakarida (GOS). Istilah FOS dan GOS pada kemasan makanan belakangan ini menjadi semacam nilai tambah untuk produk kemasan tersebut. Beberapa penelitian memang telah membuktikan perpaduan dua unsur tersebut mampu menggiatkan perkembangbiakan bakteri yang menguntungkan di saluran pencernaan (terutama usus besar/kolon) manusia, khususnya *Bifidobacterium sp* dan *Bacteroides sp*. Keuntungannya bagi kita, kehadiran bakteri baik membuat penyerapan makanan menjadi lebih optimal. Ketika bakteri-bakteri baik ‘memakan’ FOS, maka pertumbuhan mereka di kolon

akan semakin banyak sehingga mampu menciptakan suasana asam di dalam saluran pencernaan yang akhirnya akan menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab penyakit. Itulah sebabnya FOS-GOS digolongkan sebagai prebiotik (Maiorano,2007).

FOS-GOS juga digolongkan sebagai komponen pangan fungsional, yaitu komponen makanan yang terproses sedemikian rupa sehingga memiliki fungsi kesehatan bagi tubuh manusia . FOS-GOS dikatakan sebagai pangan fungsional karena selain dapat dimanfaatkan oleh bakteri-bakteri baik yang terdapat dalam saluran pencernaan juga tidak terdekomposisi oleh enzim-enzim pencernaan. Perpaduan FOS dan GOS juga secara efektif dapat memperkuat daya tahan tubuh secara alami (Yun, 1996).

Dari berbagai sumber, adanya FOS dalam tubuh memiliki manfaat yang lebih banyak lagi, berikut manfaat-manfaatnya:

1. Meningkatkan kemampuan adaptasi bakteri baik di usus besar.
2. Mengurangi jumlah bakteri *Clostridium perfringens* di dalam saluran pencernaan dan mengurangi produk antara pada proses pembusukan makanan di urin dan feses.
3. Mengurangi metabolit toksik dan enzim yang tidak dibutuhkan. Proses pencernaan 3-6 g FOS dan GOS per hari dapat mengurangi produksi zat toksik di saluran pencernaan, serta dapat mengurangi enzim yang tidak dibutuhkan berturut-turut sebanyak 44,6% dan 40,9%.
4. Meningkatkan absorpsi berbagai macam mineral di dalam saluran pencernaan, seperti besi dan kalsium.
5. Mencegah terjadinya konstipasi. Hal tersebut berhubungan dengan produksi asam lemak rantai pendek oleh *Bifidobacteria*, yang akan merangsang gerakan peristaltis saluran pencernaan dan meningkatkan kelembaban feses sehingga mudah dikeluarkan.
6. Mencegah diare, baik itu yang disebabkan oleh bakteri patogen ataupun tidak. Juga mencegah sembelit dan membuat penyerapan makanan menjadi lebih baik.

7. Mengurangi konsentrasi kolesterol di dalam serum darah. Berdasarkan eksperimen terhadap hewan percobaan, FOS terbukti dapat menurunkan kadar gula darah pada penderita diabetes dan menekan peningkatan kadar kolesterol serta mampu mengurangi tekanan darah.
8. FOS dan GOS juga memiliki efek antikarsinogenik (mencegah kanker). Hal tersebut berhubungan dengan meningkatnya kekebalan tubuh seseorang.
9. Secara tidak langsung meningkatkan produksi nutrisi, seperti vitamin B1, B2, B6, B12, asam nikotinat, dan asam folat (Yun, 1996).

Singkatnya, dengan mengonsumsi FOS tubuh akan menjadi lebih sehat. Agar dapat memberikan manfaat fisiologis, beberapa peneliti menyarankan dosis efektif minimum bagi FOS. FOS memiliki efektif prebiotik untuk anak-anak adalah sekitar 1-3 gram per-hari dan 5-15 gram per-hari untuk orang dewasa. Di Jepang, jumlah asupan FOS yang bisa diterima tubuh sekitar 0,8 g per kg berat badan dalam tiap harinya (Yun, 1996).

Setelah bayi disapih dan berhenti mengonsumsi ASI yang mengandung FOS, secara perlahan-lahan jumlah bakteri baik dalam usus akan menurun. Oleh karena itu setelah berhenti diberi ASI, bayi atau balita dianjurkan untuk mengonsumsi susu formula yang mengandung FOS atau makanan yang banyak mengandung zat gizi lainnya seperti jus buah, sereal, atau pangan olahan susu lainnya.

Tidak hanya terkandung dalam ASI, secara alami ternyata FOS juga banyak terdapat dalam buah dan sayuran. Misalnya ekstrak bawang merah, bawang putih, gandum, pisang, tomat, madu, Jerusalem arthichoke, akar chicory, dan asparagus (Maiorano dkk, 2007). Namun karena berasal dari tanaman, maka senyawa ini tidak bisa diperoleh dalam jumlah besar dan pasti, bergantung kondisi tanam. Berdasarkan hal tersebut dan keuntungan yang dimilikinya, maka usaha untuk mensintesis FOS dalam skala industri mulai dikembangkan.

Tidak hanya berfungsi sebagai prebiotik, FOS pun bisa digunakan sebagai bahan pemanis. Hal ini disebabkan FOS memiliki tingkat kemanisan yang hampir

sama dengan sukrosa. Nilai kalori yang terkandung dalam FOS juga rendah, bahkan hampir tidak ada (Yun, 1996). Sehingga FOS aman dikonsumsi oleh para penderita diabetes. Manis, rendah kalori, dan memiliki efek prebiotik menjadikan FOS senyawa yang sangat diminati oleh para konsumen sebagai bahan tambahan dalam makanan.

Melihat aspek keekonomisan suatu produk dalam sebuah industri, telah dilakukan penelitian di berbagai negara untuk mengembangkan produksi FOS secara bioteknologi. Secara komersial, FOS dapat diproduksi dengan proses degradasi inulin atau dengan transfruktosilasi (Sangeetha dkk, 2005). Berbagai mikroorganisme telah dipelajari dalam aplikasinya untuk menghasilkan senyawa FOS. Sampai saat ini, FOS biasanya disintesis dengan bantuan enzim dari mikroorganisme tertentu seperti *Penicillium expansum*, *Kluyveromyces marxianus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Rhodotolura sp*, dan lain sebagainya (Maiorano dkk, 2007). Enzim spesifik dari mikroorganisme penghasil FOS melalui reaksi transfruktosilasi tersebut adalah β -fruktofuranosidase (EC.3.2.1.26) dan fruktosiltransferase (EC.2.4.1.9).

1.2 Rumusan Masalah

Di Indonesia produk-produk makanan kemasan yang mengandung FOS belum banyak tersedia di pasaran. Di beberapa negara (Selandia Baru dan Australia), produk biskuit, mentega, cokelat, wafer, dan lainnya sudah banyak yang diolah sedemikian rupa sehingga mengandung FOS. Hal ini disebabkan industri di Indonesia masih banyak mengimport FOS dengan harga yang relatif mahal. Alasan utama dari pengimportan adalah karena FOS hanya dapat diekstrak secara maksimal dari tanaman chicory yang tidak dibudidayakan di Indonesia. Oleh karena itu, alternatif sumber FOS yang disintesis dari sukrosa dengan mikroorganisme merupakan hal yang prospektif untuk dikembangkan di Indonesia.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, kapang jenis *Aspergillus* merupakan mikroorganisme yang dapat menghasilkan FOS dalam jumlah yang cukup besar (Sangeetha dkk, 2005). Namun tidak menutup kemungkinan bahwa terdapat mikroorganisme lain yang bisa menghasilkan FOS sebaik *Aspergillus* tersebut. Karena itu pada penelitian ini digunakan kapang jenis *Penicillium notatum* sebagai subjek produksi FOS.

1.3 Tujuan Penelitian

Penelitian yang dilakukan bertujuan untuk mengidentifikasi senyawa FOS yang dihasilkan dari fermentasi sukrosa oleh *Penicillium notatum*. Pertama dicari waktu optimum pada *Penicillium notatum* dalam menghasilkan FOS dari fermentasi sukrosa (20%), kemudian mengisolasi FOS yang dihasilkan pada fermentasi ini yang dilanjutkan dengan identifikasi. Hasil penelitian diharapkan dapat memberikan informasi bagi penelitian-penelitian aplikasi mikroorganisme, khususnya dalam bidang industri di Indonesia, mengenai kemampuan kapang *Penicillium notatum* dalam menghasilkan FOS.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Prebiotik dan Probiotik

Probiotik secara umum didefinisikan sebagai tempat makanan suplemen yang memberikan manfaat bagi induk hewan yang meningkatkan hubungan keseimbangan mikrobia dalam usus. Bakteri probiotik dapat mempengaruhi sistem kekebalan tubuh melalui beberapa mekanisme molekular. Populasi bakteri pada saluran gastrointestinal manusia yang mendasari ekosistem yang sangat kompleks. Kebanyakan dari organisme ini memberi keuntungan, contohnya *Bifidobacterium* dan *Lactobacillus*.

Prebiotik merupakan komposisi pangan yang tidak dapat dicerna. Ini meliputi inulin, fruktooligosakarida (FOS), galaktooligosakarida, dan laktosa. FOS secara alami terjadi pada karbohidrat yang tidak dapat dicerna oleh manusia. FOS ini juga mendukung pertumbuhan bakteri Bifidobacteria. Secara umum proses pencernaan prebiotik memiliki karakteristik dengan adanya perubahan dari kepadatan populasi mikrobia (Çaglar dkk, 2005).

Ada beberapa urutan dalam menggolongkan komponen prebiotik, yaitu

1. Prebiotik harus tidak dapat dihidrolisis maupun diserap dalam bagian saluran gastrointestinal.
2. Prebiotik menjadi substrat untuk aktivitas atau pertumbuhan dari satu atau jumlah yang terbatas pada koloni bakteri yang menguntungkan.
3. Prebiotik mampu mengubah koloni mikroflora ke arah komposisi yang sehat.
4. Prebiotik berpengaruh pada luminal atau sistem yang menguntungkan yang memiliki efek kesehatan bagi inangnya (Wahlqvist, 2002).

Perbedaan mendasar antara probiotik dengan prebiotik adalah probiotik terdiri dari mikroorganisme hidup sedangkan prebiotik merupakan serat yang

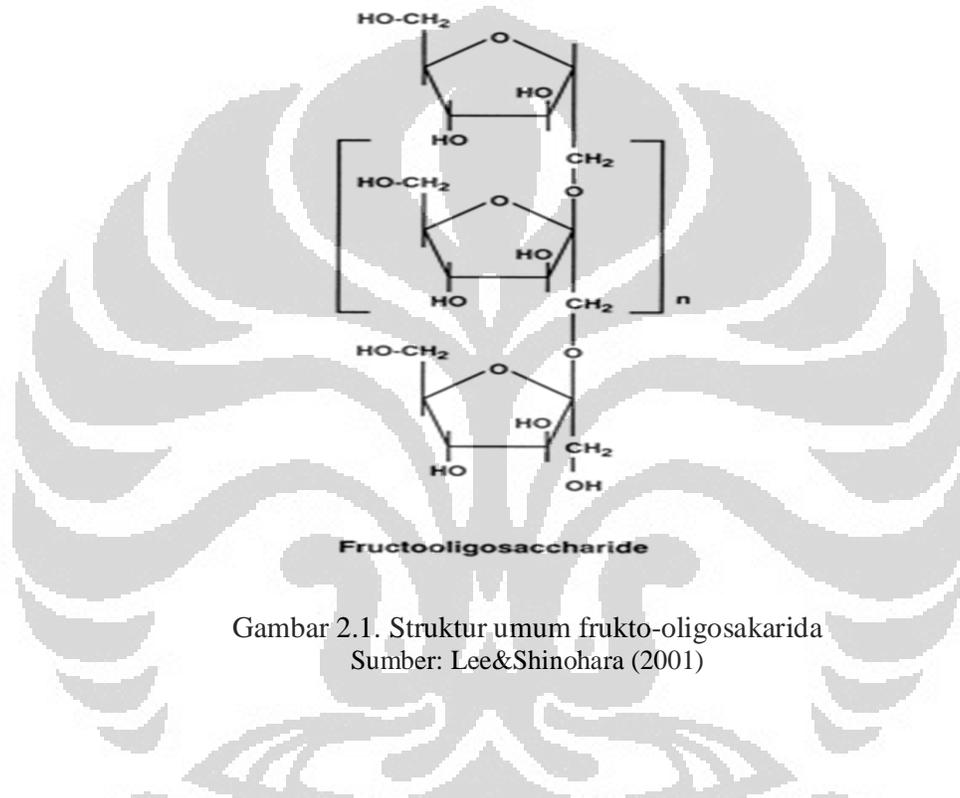
menjadi makanan bagi mikroorganisme. Berikut ini adalah 5 hal yang membedakan probiotik dengan prebiotik (Wordpress.com).

1. Probiotik merupakan mikroorganisme hidup yang dikonsumsi untuk menjaga keseimbangan sistem pencernaan di usus. Prebiotik merupakan sejenis serat khusus yang bisa menjadi makanan bagi mikroorganisme di dalam usus.
2. Minuman probiotik harus disimpan pada kondisi penyimpanan, suhu dan tingkat keasaman tertentu agar mikroorganisme di dalamnya tidak mati. Prebiotik tidak membutuhkan perlakuan demikian karena tidak mudah mengalami kerusakan.
3. Probiotik kadang berisi mikroorganisme asing yang sengaja ditambahkan ke usus untuk membantu sistem pencernaan. Prebiotik hanya memberi makan pada mikroorganisme yang secara alami sudah ada di usus.
4. Probiotik terkandung dalam makanan atau minuman yang difermentasi misalnya yoghurt. Prebiotik diambil dari serat alami yang terdapat pada 36.000 jenis tumbuh-tumbuhan.
5. Probiotik mengusir mikroorganisme jahat dari usus secara langsung dengan cara mendominasi perebutan nutrisi di tempat itu. Prebiotik mengusir dengan cara menciptakan kondisi keasaman tertentu yang tidak disukai oleh mikroorganisme jahat.

Meski memiliki banyak perbedaan, prebiotik dan probiotik punya kesamaan antara lain sama-sama berguna untuk menjaga kesehatan sistem pencernaan dengan cara memelihara keseimbangan mikroorganisme baik di dalam usus. Manfaat keduanya telah dibuktikan dalam berbagai penelitian ilmiah (Wordpress.com).

2.2 Frukto-Oligosakarida (FOS)

Frukto-Oligosakarida (FOS) merupakan jenis polisakarida rantai pendek yang tersusun oleh monomer glukosa-fruktosa (GF_n) atau fruktosa (F_m) dengan banyaknya *n* dan *m* berkisar antara 1-6 (Murniasih, 2010).



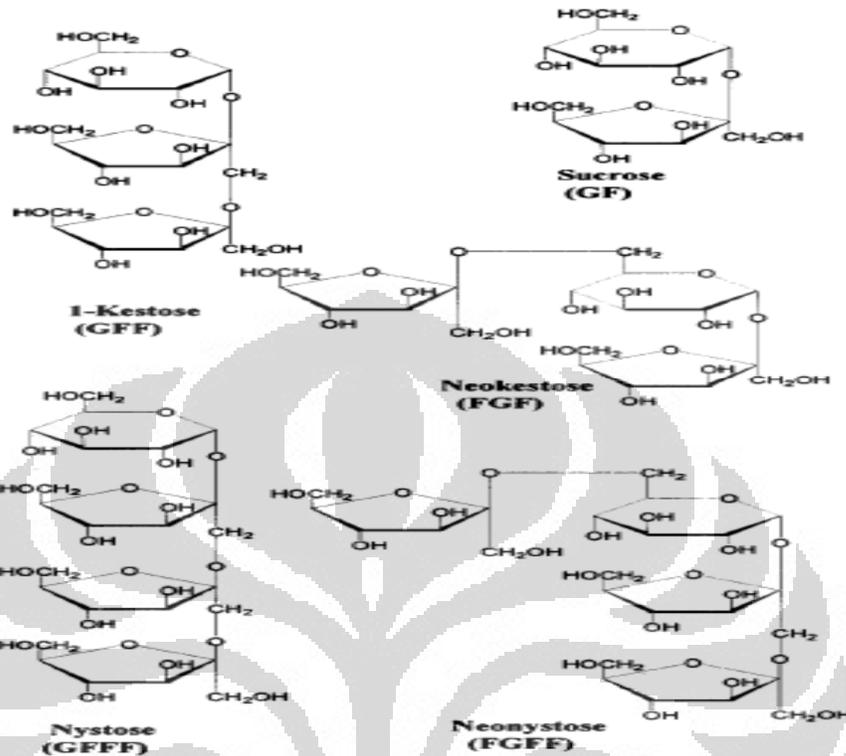
Gambar 2.1. Struktur umum frukto-oligosakarida
Sumber: Lee&Shinohara (2001)

FOS dapat dibuat dari transfruktosilasi sukrosa atau degradasi inulin menggunakan enzim yang ada pada beberapa jenis mikroorganisme. Enzim merupakan suatu protein yang bertindak sebagai katalisator reaksi biologis (biokatalisator) dalam sel hayati yang spesifik. Enzim 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 (Poonawalla dkk, 2005). Beberapa substrat yang diketahui dapat menghasilkan FOS menggunakan enzim ini antara lain sukrosa, raffinosa, dan inulin.

Jenis FOS GF_n pada umumnya disintesis melalui proses transfuktosilasi sukrosa menggunakan enzim β -fruktosidase yang dihasilkan oleh mikroorganisme tertentu. Pada proses transfuktosilasi, dihasilkan FOS jenis GF_n dengan derajat polimerasi 1-5. Beberapa mikroorganisme memproduksi enzim β -fruktofuranosidase untuk sintesis FOS dari sukrosa. Dalam sintesis FOS dari sukrosa ini, enzim β -fruktosidase mempunyai 2 jenis tipe. Jenis pertama (F1) berperan dalam sintesis FOS melalui proses transfuktosilasi dari sukrosa, sedangkan jenis kedua (F2) berperan dalam hidrolisis sukrosa menjadi glukosa dan fruktosa. Produk FOS yang dihasilkan dengan proses tersebut adalah 1-kestose, nistose, dan fruktosil nistose (Yun, 1996).

Yang termasuk dalam golongan FOS adalah 1-kestose (GF₂; Fru_f β 2->1 Fru_f β 2->1 α Glc), nistose (GF₃; Fru_f β 2->1 Fru_f β 2->1 Fru_f β 2->1 α Glc), fruktofuranosyl nistose (GF₄), bifucose (GF₃), inulobiose (F₂), inulotriose (F₃), inulotetraose (F₄), neo-kestose (Fru_f β 2->6 α 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 4 hari pada suhu 25±2°C.



Gambar 2.2. Jenis-jenis senyawa frukto-oligosakarida
Sumber: Lee&Shinohara (2001)

FOS banyak berasal dari sayur-sayuran (bawang merah, asparagus, *artichoke*, dan tomat). FOS merupakan serat pangan yang tidak tercerna yang membantu menjaga kesehatan saluran pencernaan. Senyawa FOS dapat digunakan sebagai pemanis atau pengganti sukrosa rendah kalori (Yun, 1996). FOS dikatakan sebagai pangan fungsional karena keduanya tidak terdekomposisi oleh enzim-enzim pencernaan dan keduanya dapat dimanfaatkan oleh bakteri-bakteri baik yang terdapat dalam kolon atau usus besar, khususnya *Bifidobacterium* sp dan *Bacteroides* sp serta akan menghambat pertumbuhan bakteri patogen penyebab penyakit. Sekalipun digunakan sebagai pemanis, FOS tidak memengaruhi jumlah gula darah sehingga aman dikonsumsi oleh penderita diabetes.

Tabel 2.1. 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
Garliphants	102	93	97
rye flour	70	90	83
Sportalyte	112	109	97

^a 1-Kestose. ^b Nystose. ^c 1^F- β -Fructofuranosyl-nystose.

Sumber: Hogarath et al., (2000)

Manfaat lain dari FOS yaitu dapat mengurangi metabolit toksik dan enzim yang tidak dibutuhkan, mencegah diare, meningkatkan absorpsi berbagai macam mineral (Fe, Ca, dll) di dalam saluran pencernaan, mencegah terjadinya konstipasi, mengurangi konsentrasi kolesterol di dalam serum darah, mengurangi tekanan darah. Fungsi tambahannya yaitu memiliki efek antikarsinogenik (mencegah kanker), dan secara tidak langsung meningkatkan produksi nutrisi (vitamin B1, B2, B6, B12, asam nikotinat, dan asam folat) serta menstabilkan kadar gula darah (Yun, 1996).

Perlakuan FOS, sebagai prebiotik, dalam sistem pencernaan manusia nampak dalam tabel dan gambar berikut.

Tabel 2.2. 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
Anus	Tidak ada ekskresi prebiotik

2.3 Transfruktosilasi

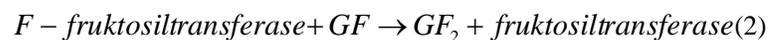
Merupakan reaksi pembentukan fruktooligosakarida melalui transfer gugus fruktosil. Substrat yang digunakan umumnya adalah sukrosa, sedangkan enzim yang digunakan antara lain: β -fruktofuranosidase (EC 3.2.1.26) atau fruktosiltransferase (EC 2.4.1.9). Reaksi transfruktosilasi dengan menggunakan mikroorganisme biasanya akan berkompetisi dengan hidrolisis. Hal seperti ini akan dapat menurunkan produk FOS yang diinginkan. Oleh karena itu, maka kondisi reaksi harus diperhitungkan.

Tabel 2.3. Beberapa mikroorganisme, enzim, dan kondisi optimal dalam menghasilkan FOS

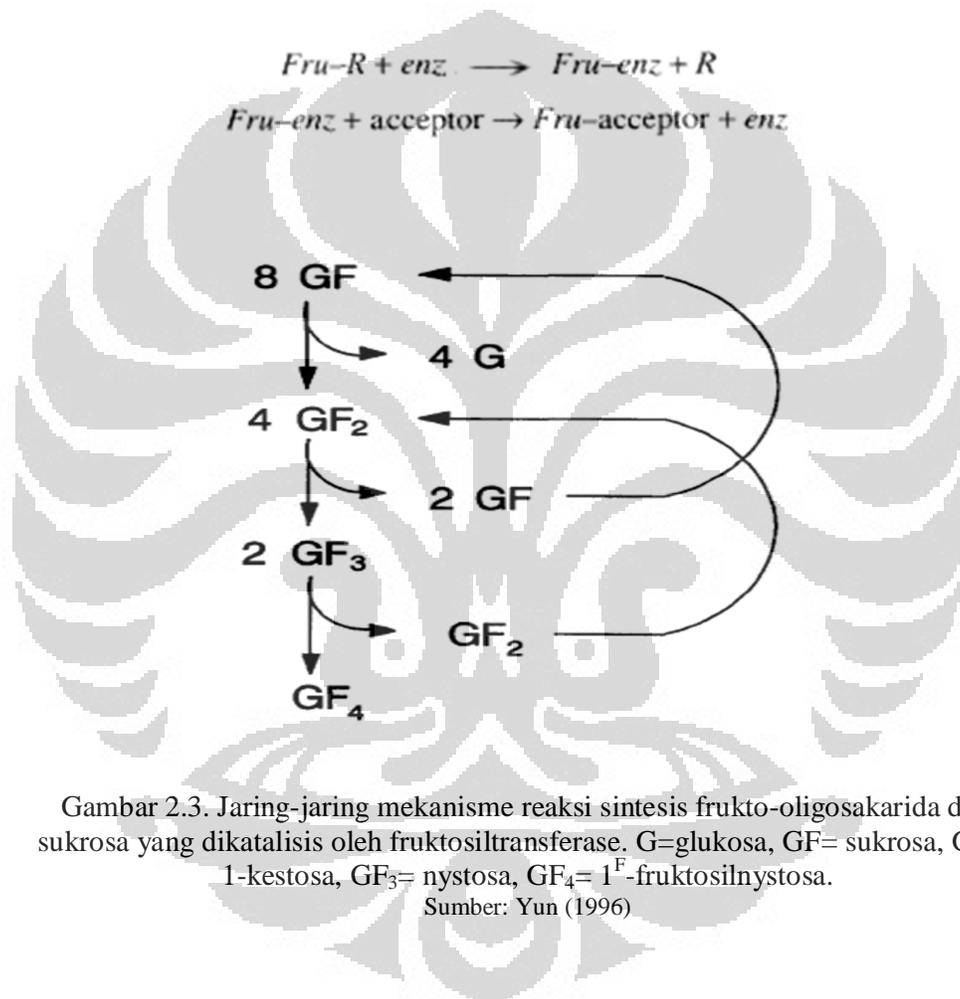
Microorganism	Enzyme	Optimal conditions	Y_{FOS}^*
<i>Acetobacter diazotrophicus</i>	Levansucrase (E.C. 2.4.1.10) – Free enzyme	40 °C – pH 5.5 – 18 hours – 200 rpm – sucrose 60%	Y_{FOS} : 50%
<i>Bacillus macerans</i>	Fructosyltransferase (E.C. 2.4.1.9) – Free enzyme	50 °C – pH 7.0 – 100 hours – sucrose 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) (x 100).

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 2.3. 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)

2.4 *Penicillium notatum*

Kapang merupakan jamur multiseluler yang dapat menghasilkan enzim atau hasil metabolit lain. *Penicillium* (latin: penicillius=paintbrush) merupakan jenis jamur yang dikenal karena memiliki kemampuan untuk menghasilkan penicilin (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.



Gambar 2.4. Morfologi *Penicillium notatum*

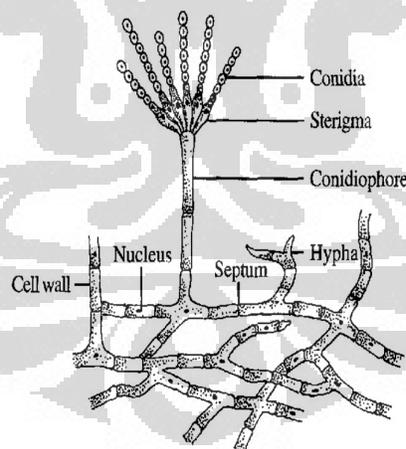
Penicillium notatum sendiri merupakan jenis jamur ascomycota anaerob obligat yang sekarang disebut sebagai *Penicillium chrysogenum*. Jenis ini merupakan penghasil β -laktam, suatu antibiotik. Metabolit sekunder yang juga dihasilkannya antara lain: roquefortin C, meleagrins, chrysogin, xanthocillin, 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, fosfo-glukonat dehidrogenase, glukosa oksidase.

Tabel 2.4. Klasifikasi *Penicillium notatum*

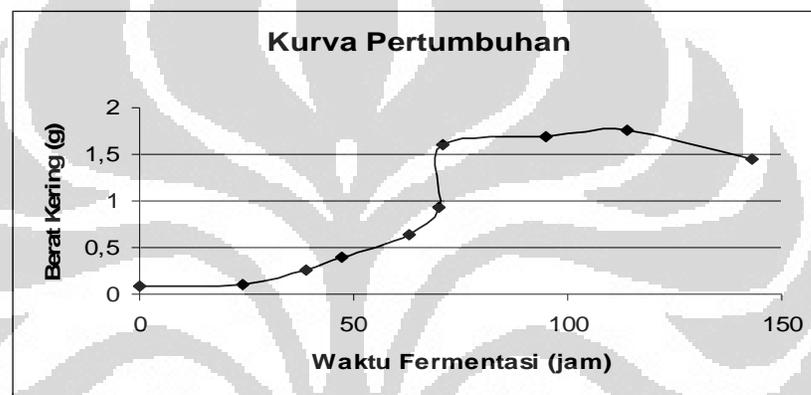
Kingdom	Fungi
Filum	Ascomycota
Kelas	Eurotiomycetes
Sub-kelas	Eurotiomycetidae
Ordo	Eurotiales
Familia	Trichocomaceae
Genus	<i>Penicillium</i>
Spesies	<i>Penicillium notatum</i>



Gambar 2.5. Struktur *Penicillium*

Beberapa peneliti sebelumnya telah diperoleh data bahwasannya kapang jenis *penicillium* dapat digunakan untuk memfermentasikan sukrosa menjadi FOS. Begitupun dengan *Penicillium notatum*. Spesies ini ditumbuhkan pada suhu ruang dalam media PDA (*potato dekstrose agar*).

Kurva pertumbuhan dari *Penicillium notatum* berdasarkan berat kering yang dihasilkan terhadap waktu fermentasi bisa dilihat pada kurva dibawah.



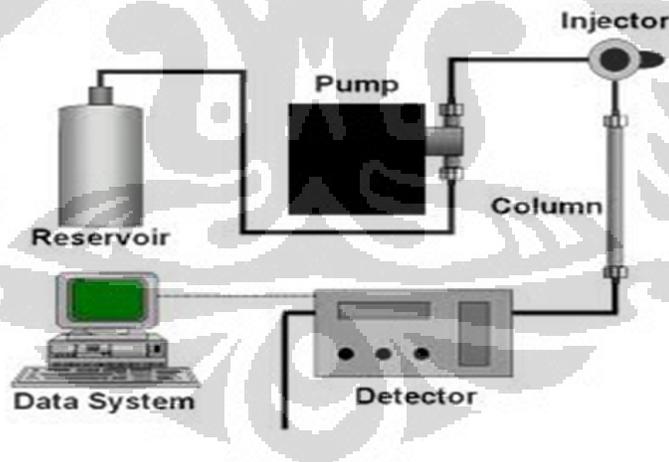
Gambar 2.6. Kurva pertumbuhan *Penicillium notatum* (Rifan,2011)

Dari kurva tersebut dapat dilihat bahwa pertumbuhan *Penicillium notatum* mengalami peningkatan di sekitar jam ke 72 (atau 3 hari) dan selanjutnya hampir tidak mengalami pertumbuhan lagi. Dengan kata lain, jumlah miselium tidak bertambah sekalipun waktu fermentasi bertambah (Rifan, 2011)

2.5 *High Performance of Liquid Chromatography (HPLC)*

HPLC merupakan salah satu teknik pemisahan modern. HPLC terdiri dari fase gerak, pompa, injektor, kolom, dan detektor. HPLC dapat digunakan untuk menganalisis senyawa organik maupun anorganik. Teknik pemisahan tersebut dapat menganalisis komponen dengan berat molekul yang tinggi seperti polimer.

Mekanisme kerja HPLC, yaitu fasa gerak cair dialirkan melalui kolom ke detektor dengan bantuan pompa. Larutan yang ingin diketahui komponennya kemudian dimasukkan ke dalam aliran fasa gerak dengan cara penyuntikan. Pemisahan komponen-komponen terjadi di dalam kolom. Komponen yang kurang kuat interaksinya dengan fase diam akan keluar lebih cepat sedangkan komponen yang kuat interaksinya akan keluar lebih lama. Setiap komponen yang keluar dari kolom deteksi oleh detektor kemudian direkam dalam bentuk kromatogram. Jumlah puncak yang keluar pada kromatogram menyatakan jumlah komponen sedangkan luas area dan tinggi puncak menyatakan konsentrasi komponen.



Gambar 2.7. Skema umum perangkat HPLC

BAB III

METODELOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat yang digunakan

Dalam penelitian ini peralatan gelas yang digunakan antara lain : tabung reaksi, tabung sentrifuge, rak tabung, jarum ose, erlenmeyer, batang pengaduk, neraca analitik, autoklaf, hot plate, pipet tetes, pipet volumetri (1; 5; 10; 20; 25 mL), pipet ukur (1 dan 5 mL), labu bulat, gelas ukur, cawan petri, corong gelas, bunsen, beaker gelas, spatula, botol semprot.

Alat penunjang yang digunakan yaitu : *mixer*, autoklaf, oven, pH indikator, alat sentrifugasi, timbangan analisis, *shaker incubator*, *heating mantel*, *syringe*, dan HPLC Shimadzu Prominence 20 dengan kolom Shimpack SCR-101C, detektor Refraktif Indeks (RID-10A), pompa LC-20AB.

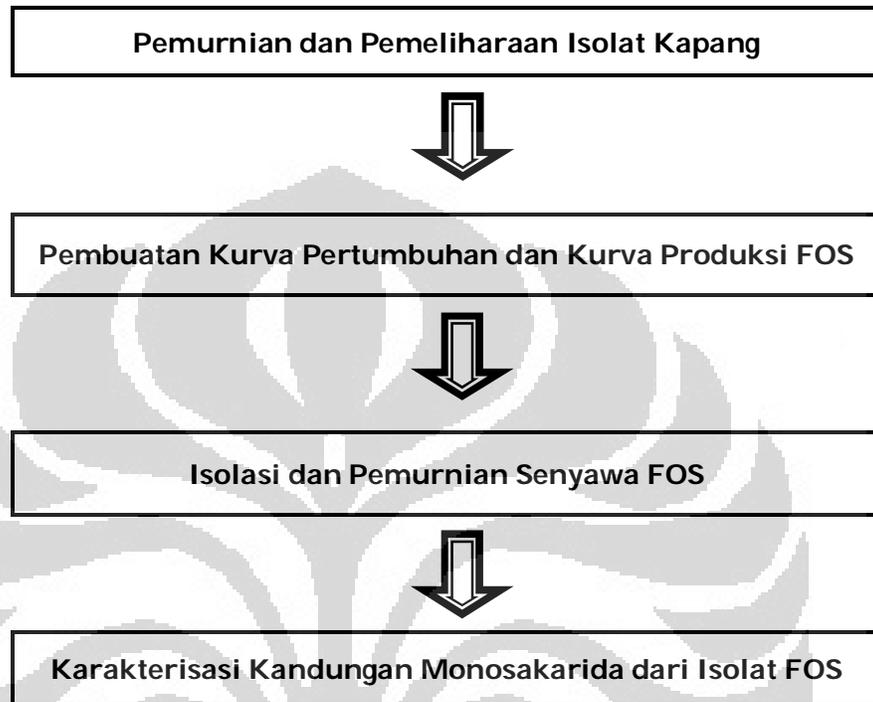
3.1.2 Bahan kimia yang digunakan

Etanol 95%, HCl pekat, NaOH, TCA 15%, aqua destilata, glukosa, sukrosa, FOS standar, ekstrak ragi (*yeast extract*), PDA (*potato-dextrose-agar*), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $NaNO_3$, K_2HPO_4 , KCl, alcohol 70%, resin penukar kation dan anion, karbon aktif, kertas saring, filter membran Nitroselulosa nitrat dan Whatman 47.

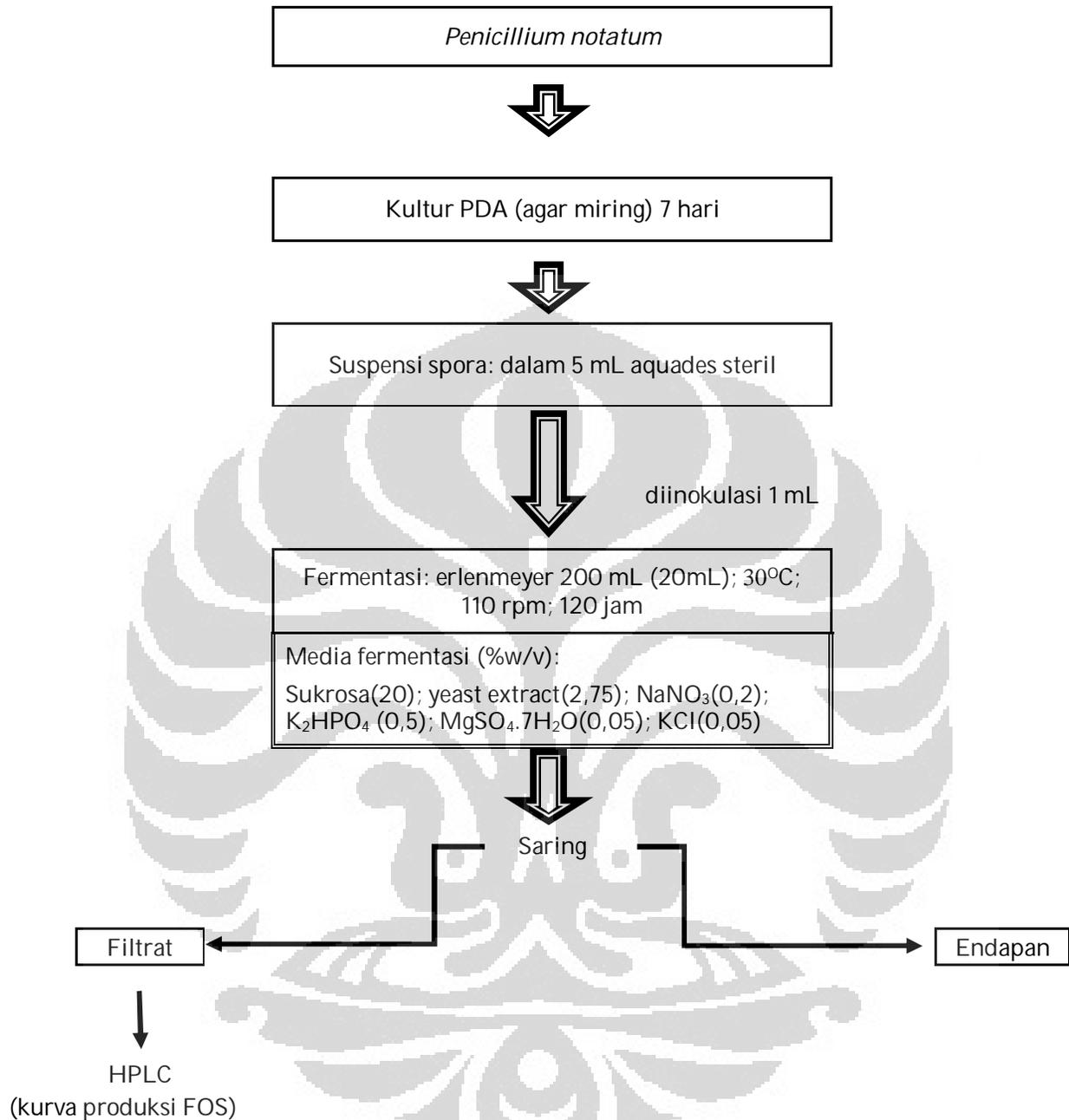
3.1.3 Mikroorganisme yang digunakan

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah kapang jenis *Penicillium notatum* IPBCC.07.555 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Institut Pertanian Bogor *Culture Center* (IPBCC), Bogor.

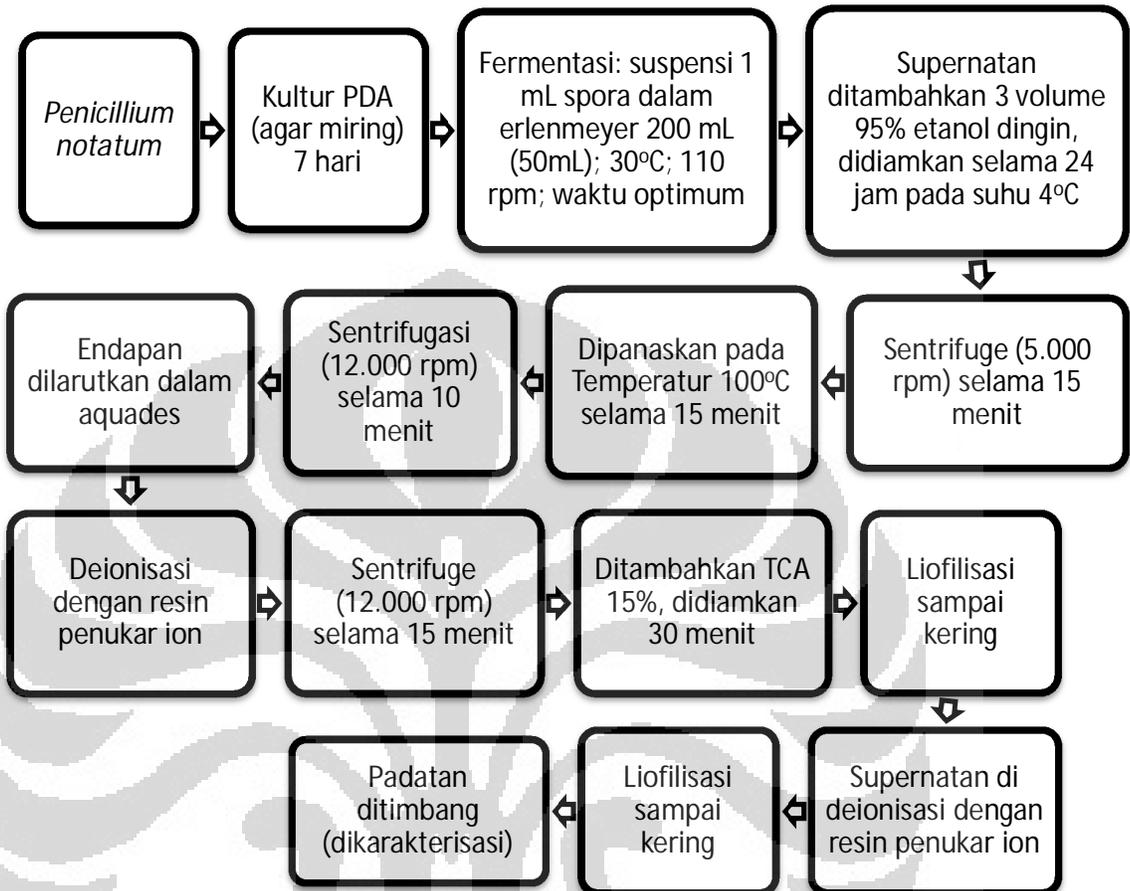
Bagan Kerja



Gambar 3.1. Diagram umum alur kerja penelitian



Gambar 3.2. Skema kerja fermentasi



Gambar 3.3. Skema alur kerja isolasi dan pemurnian produk FOS

3.2 Prosedur Kerja

3.2.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Semua alat-alat gelas yang akan digunakan untuk fermentasi, sebelumnya dilakukan sterilisasi kering menggunakan oven pada suhu 160°C selama satu jam. Untuk alat-alat plastik dan medium fermentasi ataupun agar, dilakukan sterilisasi basah menggunakan autoklaf pada suhu 121°C pada tekanan 2 atm selama 15 menit. Sterilisasi pada autoklaf juga dilakukan pada kapang atau suspensi atau medium (berisikan kapang) yang telah selesai digunakan dan akan dibuang.

3.2.2 Pembuatan Larutan Standar

Larutan standar sukrosa/glukosa/FOS 100.000 ppm dibuat dengan menimbang 10 g sukrosa/glukosa/FOS yang dimasukkan ke dalam labu ukur 100mL kemudian ditambahkan aquabides sampai tanda batas. Larutan ini selanjutnya digunakan sebagai larutan induk untuk membuat larutan standar sukrosa/glukosa/FOS berikutnya dengan variasi konsentrasi 10.000; 25.0000; 50.000; dan 75.000 ppm. Larutan induk sukrosa 100.000 ppm dipipet sebanyak 1; 2,5; 5; dan 7,5mL, kemudian masing-masing dimasukkan ke dalam labu ukur 10mL dan ditambahkan aquabides sampai tanda batas.

Deret larutan standar sukrosa/glukosa/FOS ini dianalisis dengan HPLC pada kondisi kecepatan alir 1 mL/menit selama 10 menit, suhu oven 80°C , dan fase gerak aquabides. Diperoleh nilai waktu retensi untuk uji kualitatif dan nilai luas area untuk uji kuantitatif. Dari nilai luas area dan konsentrasi masing-masing larutan standar sukrosa, dibuat persamaan garis regresi linier.

3.2.3 Persiapan Mikroorganisme

Dalam penelitian ini, digunakan sel mikroba berupa kapang dari spesies *Penicillium notatum* yang didapat dari laboratorium Mikrobiologi IPBCC. Media agar yang digunakan untuk pertumbuhan adalah media PDA dalam tabung agar miring (5-6 mL) yang telah didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang (Prata dkk, 2010). Untuk keperluan fermentasi, biakan dipindahkan secara aseptis ke dalam media agar miring yang telah disiapkan, kemudian diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 3-7 hari.

3.2.4 Penentuan Jumlah Sel Mikroba

Penentuan jumlah sel mikroba dilakukan dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Media pertumbuhan menggunakan PDA dalam cawan petri (d = 15 cm) sebanyak 15mL dan didiamkan sehari semalam pada suhu ruang sebelum pemakaian. Spora dalam tabung agar miring dilarutkan dalam 5mL air steril dan dihomogenasikan. Dari suspensi spora, dipipet 1mL dan dilakukan pengenceran hingga 10^{-7} . Sebanyak 0.1mL dari faktor pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} masing-masing diinokulasikan dengan metode sebar ke dalam cawan petri yang telah terisi medium PDA. *Penicillium notatum* yang akan dihitung koloninya tersebut diinkubasi pada suhu 25-28°C selama 48 jam.

Perhitungan jumlah koloni/mL (CFU/mL) dari *Penicillium notatum* dilakukan pada waktu inkubasi 0, 12, 36, dan 48 jam. Jumlah koloni kapang per mL larutan suspensi pada akhir inkubasi dihitung dengan rumus :

$$CFU = \frac{\text{jumlah koloni}}{\text{volume inokulum} \times \text{faktor pengenceran}}$$

Sehingga bisa diketahui banyaknya jumlah kapang dalam 1mL suspensi sporanya.

3.2.5 Fermentasi

- **Pembuatan Media Fermentasi**

Fermentasi dilakukan dalam fase cair. Komposisi media antara lain (% w/v) = sukrosa (20), *yeast extract* (2,75), NaNO_3 (0,2), K_2HPO_4 (0,5), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,05) dan KCL (0,05). Semua bahan dicampurkan dan dilarutkan dalam aquabides (Prata dkk, 2010). Media tersebut diisi sebanyak 20 mL ke dalam labu erlenmeyer 200 mL yang kemudian disterilkan dengan autoklaf.

- **Pembuatan Kurva Produksi FOS**

Pembuatan kurva produksi FOS dilakukan untuk mengetahui waktu optimum *Penicillium notatum* dalam menghasilkan FOS. Proses dengan memanfaatkan kemampuan kapang *Penicillium notatum* ini dilakukan berdasarkan pada penelitian sebelumnya (Prata dkk, 2010) yang telah dimodifikasi.

Dalam erlenmeyer 200 mL yang berisi 20 mL medium fermentasi, diinokulasi 1 mL suspensi spora dan diinkubasi pada suhu 30°C dalam *shaker incubator* 100 rpm. Sepuluh erlenmeyer medium fermentasi yang telah diinokulasi, diinkubasi dengan waktu yang berbeda, yaitu 0, 28, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 120, dan 170 jam.

3.2.6 Analisis Awal Produk Fermentasi

Produk FOS dan gula residu lainnya ditentukan menggunakan instrumentasi HPLC (Musatto dkk, 2009). Kolom yang digunakan adalah shim-pack SCR-101C (yang merupakan kolom penukar ion ; terdiri dari kalsium dengan kopolimer stiren divinilbenzena), temperatur kolom dijaga pada suhu 80°C dan menggunakan detektor indeks refraktif RID-10A. Aquabides digunakan sebagai fasa geraknya dengan menggunakan laju alir 1 mL/menit, sampel yang diinjeksikan ke dalam HPLC adalah sebanyak 20 μL . hasilnya diamati dan dibandingkan waktu retensinya dengan standar.

Sebelum diinjeksi, sampel disaring dengan kertas saring Whatman 41, direaksikan dengan karbon aktif dan disaring kembali. Filtrat kemudian di deionisasi dengan resin penukar ion (anion dan kation) sampai pH netral (pH 7). Identifikasi senyawa FOS dilakukan dengan menggunakan standar FOS. Konsentrasi FOS dapat ditentukan berdasarkan kurva standar. Sukrosa dan oligomer dapat dipisahkan (terelusi) berdasarkan derajat polimerisasinya. Pembentukan atau produktivitas FOS dari *Penicillium notatum* diukur berdasarkan total FOS yang terbentuk terhadap waktu fermentasi.

3.2.7 Identifikasi Senyawa FOS

- **Isolasi dan Pemurnian FOS**

Kapang *Penicillium notatum* ditumbuhkan pada medium PDA miring dan diinkubasi selama 7 hari. Biakan tersebut kemudian disuspensi dengan 5 mL aquabidest. 1 mL dari suspensi spora diinokulasi dan diinkubasi pada 50 mL medium fermentasi sukrosa (20%). Inkubasi dilakukan di *shaker incubator* dengan kecepatan 110 rpm selama waktu optimum dari percobaan fermentasi sebelumnya pada suhu 28°C.

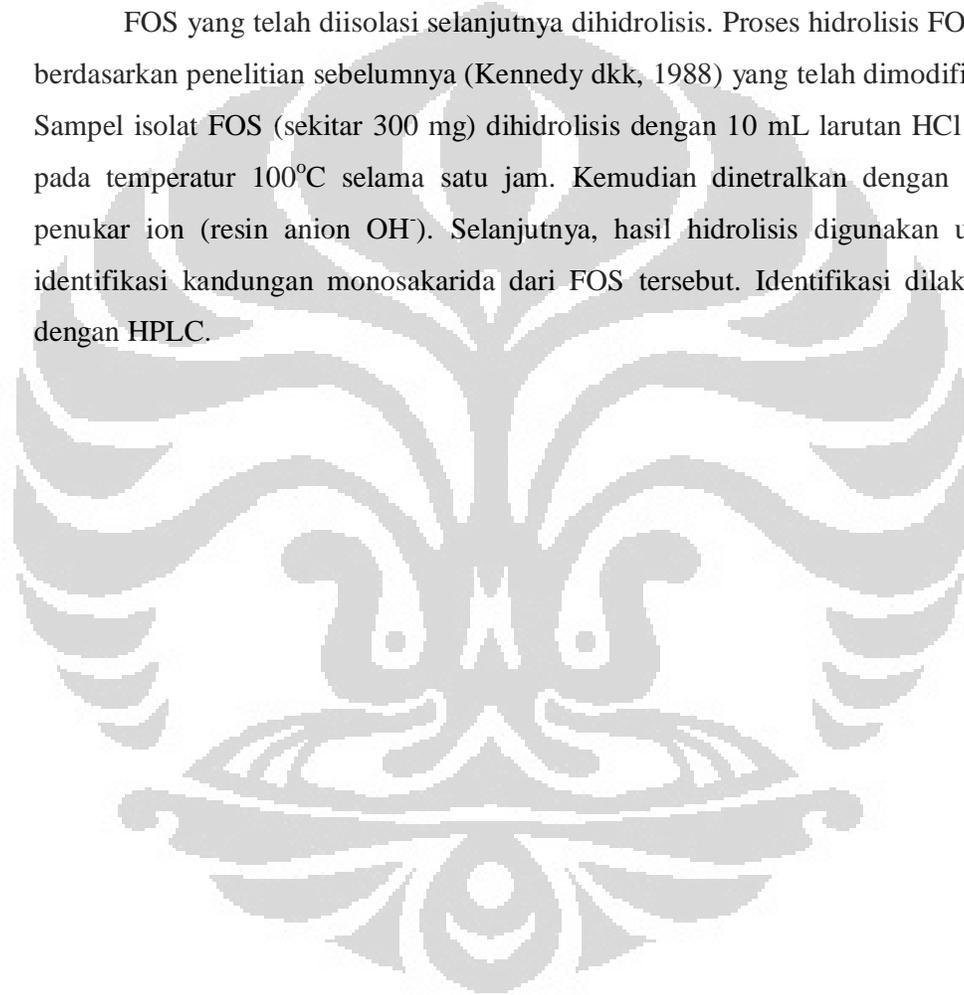
Medium fermentasi yang telah diinokulasi dan diinkubasi kemudian dipanaskan dan ditambahkan 20 µL enzim proteinase K, diinkubasi 30 menit pada suhu 65°C dan dipanaskan 15 menit pada suhu 100°C. medium kemudian di sentrifugasi dengan kecepatan 5.000 rpm selama 15 menit kemudian diambil supernatannya. FOS selanjutnya diendapkan dengan penambahan tiga volume 95% etanol dingin dan didiamkan selama 24 jam pada suhu 4°C. Endapan FOS dipisahkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 12.000 rpm.

Endapan yang terbentuk kemudian dilarutkan dengan aquades, ditambahkan resin penukar anion dan kation sampai pH netral (pH 7). Larutan tersebut lalu dipisahkan dari resin dan diliofilisasi sampai kering. FOS selanjutnya ditambahkan 10 mL TCA 15%, kemudian didiamkan selama 30 menit kemudian

disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dan diambil supernatannya kembali. Supernatan tersebut ditambahkan resin penukar anion kation sampai pH larutan netral (pH 7). Supernatan lalu dipisahkan dari resin dan diliofilisasi sampai kering. FOS yang diperoleh berupa padatan serbuk atau bubuk tersebut kemudian ditimbang.

- **Karakterisasi Isolat FOS**

FOS yang telah diisolasi selanjutnya dihidrolisis. Proses hidrolisis FOS ini berdasarkan penelitian sebelumnya (Kennedy dkk, 1988) yang telah dimodifikasi. Sampel isolat FOS (sekitar 300 mg) dihidrolisis dengan 10 mL larutan HCl 1 M pada temperatur 100°C selama satu jam. Kemudian dinetralkan dengan resin penukar ion (resin anion OH⁻). Selanjutnya, hasil hidrolisis digunakan untuk identifikasi kandungan monosakarida dari FOS tersebut. Identifikasi dilakukan dengan HPLC.



BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

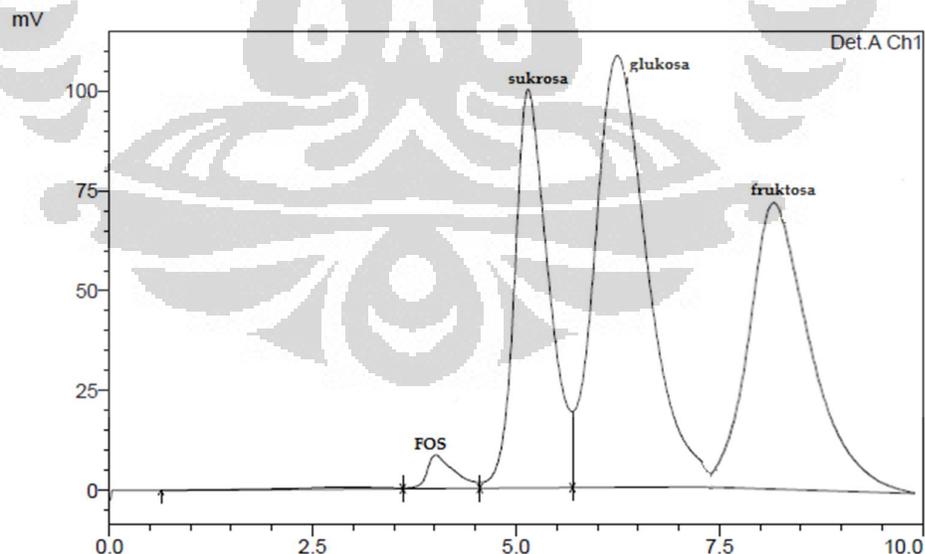
Sterilisasi alat dan bahan dilakukan untuk membebaskan suatu bahan atau benda dari semua bentuk kehidupan. Segala bentuk alat dan bahan yang akan digunakan perlu di sterilisasi untuk memperkecil kontaminasi dari mikroorganisme yang tidak diinginkan. Sterilisasi secara fisik dilakukan dengan pemanasan. Alat-alat kering yang tahan panas disterilkan dengan oven kira-kira 60-180⁰C. Sedangkan sterilisasi untuk segala macam bentuk media agar, media cair, atau cairan bekas kapang, disterilkan dengan uap air panas bertekanan menggunakan autoklaf. Autoklaf digunakan untuk mensterilkan berbagai macam alat dan bahan yang digunakan dalam mikrobiologi menggunakan uap air panas bertekanan. Tekanan yang digunakan pada umumnya 15 Psi atau sekitar 2 atm dan dengan suhu 121⁰C. Lama sterilisasi yang dilakukan biasanya 15 menit untuk 121⁰C. Semua bentuk kehidupan akan mati jika dipanaskan pada suhu 121⁰C dan tekanan 15 Psi selama 15 menit. Sterilisasi secara kimiawi juga dilakukan dengan menggunakan senyawa desinfektan, antara lain alkohol 70%.

4.2 Penentuan Kurva Standar

Adanya senyawa-senyawa yang terdapat dalam suatu larutan bisa diidentifikasi secara kualitatif dan kuantitatif dengan instrument HPLC berdasarkan larutan standarnya. Karena itu dibuat larutan standar untuk FOS, sukrosa, dan glukosa dengan variasi nilai konsentrasi. Puncak yang muncul dari larutan-larutan tersebut berupa waktu retensi yang spesifik dari tiap senyawa. Sehingga bisa digunakan untuk analisis keberadaan senyawa tersebut dalam suatu larutan. Sedangkan variasi nilai konsentrasi dari sukrosa, FOS, dan glukosa dilakukan dengan tujuan memperoleh kurva standar dari konsentrasi dari luas puncak, sehingga bisa diperoleh data secara kuantitatif.

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.

Hasil analisis standar menunjukkan bahwa waktu yang diperlukan oleh masing-masing larutan standar untuk keluar dari kolom (waktu retensi) berbeda-beda. Glukosa memiliki waktu retensi sekitar 6,2-6,3 menit, sukrosa 5,1-5,2 menit, sedangkan fruktosa 8,4 menit. FOS memiliki tiga puncak dengan waktu retensi masing-masing 4,0 menit, 5,1 menit, dan 8,2 menit. Adanya ketiga puncak tersebut kemungkinan karena FOS mengalami degradasi menjadi senyawa-senyawa penyusunnya yaitu sukrosa dan fruktosa yang teridentifikasi dari nilai puncak-puncak standar sebelumnya. Sukrosa dengan waktu retensi 5,1 menit dan fruktosa dengan waktu retensi 8,2 menit, sehingga waktu retensi untuk standar FOS itu sendiri adalah 4,0 menit.



Gambar 4.1. Kromatogram larutan standar

Telah diketahui bahwa sukrosa, yang merupakan disakarida, akan memiliki kekuatan ikatan yang lebih rendah terhadap fasa diam dibandingkan dengan monosakarida. Apalagi FOS yang merupakan oligosakarida dengan derajat polimerisasi lebih tinggi dari sukrosa. 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 FOS, sukrosa, glukosa, fruktosa, dan FOS. Dengan menggunakan persamaan yang dibentuk kurva standar, maka perbedaan konsentrasi FOS, glukosa, sukrosa, dan fruktosa selama fermentasi dapat diketahui.

4.3 Persiapan Mikroorganisme

Mikroorganisme yang digunakan dalam penelitian ini adalah jenis kapang *Penicillium notatum* dari IPBCC-Bogor yang dibiakkan dalam media pertumbuhan PDA pada tabung agar miring. Sebelum melakukan fermentasi, kapang ini dibiakkan terlebih dahulu untuk dibuat kultur stok dan *working culture*. Kultur stok dibuat untuk disimpan sebagai cadangan untuk biakan-biakan selanjutnya, sedangkan *working culture* merupakan biakan kapang yang akan siap digunakan selama penelitian.



Gambar 4.2. *Penicillium notatum* dalam medium PDA agar miring

4.4 Penentuan Jumlah Sel Mikroba

Untuk mengetahui banyaknya jumlah *Penicillium notatum* yang dihasilkan dari satu tabung agar miring digunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Metode ini dipilih karena jumlah sel yang terdapat dalam inokulum hanya digunakan untuk mengetahui banyaknya jumlah sel, tanpa menjadikannya sebagai variabel yang akan digunakan untuk fermentasi. Fermentasi yang akan dilakukan tidak dipengaruhi faktor dari banyaknya sel *Penicillium notatum*.

Pengenceran dilakukan hingga 10^{-7} . Kemudian dihitung jumlah koloni tiap harinya selama 48 jam dalam cawan petri pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7} .



Gambar 4.3. Hasil TPC *Penicillium notatum* pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7}

Tabel 4.1. Data perhitungan jumlah koloni dari hasil TPC *Penicillium notatum* pada pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , dan 10^{-7}

Faktor pengenceran	Jumlah koloni	CFU/mL
10^{-5}	311	$3,11 \times 10^8$
10^{-6}	35	$3,50 \times 10^8$
10^{-7}	4	$4,00 \times 10^8$

Dari tiga pengenceran tersebut, yang bisa digunakan sebagai data jumlah sel bagi *Penicillium notatum* hanya pada pengenceran 10^{-6} . Hal ini diartikan bahwasannya dalam 1mL suspensi spora *Penicillium notatum* sekiranya terdapat $3,50 \times 10^8$ sel unit *Penicillium notatum*.

4.5 Fermentasi Sukrosa

Dalam proses fermentasi ini, media pertumbuhan yang digunakan merupakan medium cair yang mengandung bahan campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang dibutuhkan mikroorganisme untuk pertumbuhannya. Mikroorganisme memanfaatkan nutrisi media berupa molekul-molekul kecil yang dirakit untuk menyusun komponen sel. Sukrosa dalam hal ini digunakan sebagai sumber makanan untuk kehidupan kapang.

Fermentasi dilakukan dalam *shaker incubator* dengan temperatur 30°C dan 110 rpm dengan variasi waktu pengambilan 0, 28, 45, 55, 65, 75, 85, 95, 120, dan 170 jam. Variasi waktu pengambilan labu medium ini bertujuan untuk mengetahui jumlah FOS yang dihasilkan, sehingga bisa dibuat kurva produksi FOS yang nantinya digunakan untuk menentukan waktu optimum kapang dalam menghasilkan FOS dengan jumlah maksimal.

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.

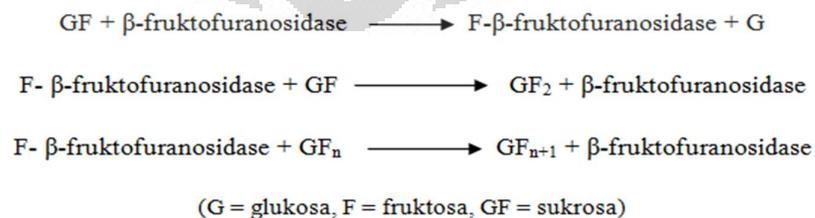


Gambar 4.4. Foto hasil fermentasi sukrosa dengan *Penicillium notatum*

4.6 Penentuan Kurva Produksi FOS

Sampel yang akan dianalisis di HPLC sebaiknya sampel bening dan tidak mengandung ion-ion pengotor karena bisa mengganggu kesensitifan puncak dari senyawa yang akan dianalisis dengan HPLC. Karena itu FOS yang akan dianalisis sebelumnya ditambahkan karbon aktif dan dideionisasi dengan menggunakan resin penukar ion (anion dan kation). Penambahan karbon aktif disertai pemanasan mampu menarik senyawa-senyawa pengotor sehingga filtrat sampel FOS menjadi lebih bening. Selanjutnya filtrat sampel dideionisasi dengan resin kation H^+ dan resin anion OH^- . 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 ketika dianalisis dengan HPLC.

Terdapat beberapa aspek yang akan dianalisis dalam penelitian kali ini, yaitu konsumsi sukrosa, produksi glukosa, fruktosa, dan FOS oleh *Penicillium notatum*. Diamati juga 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 oleh enzim β -fruktofuranosidase. Fruktosa berikatan dengan enzim β -fruktofuranosidase dan terjadi transfer gugus fruktosil terhadap sukrosa seperti reaksi berikut.



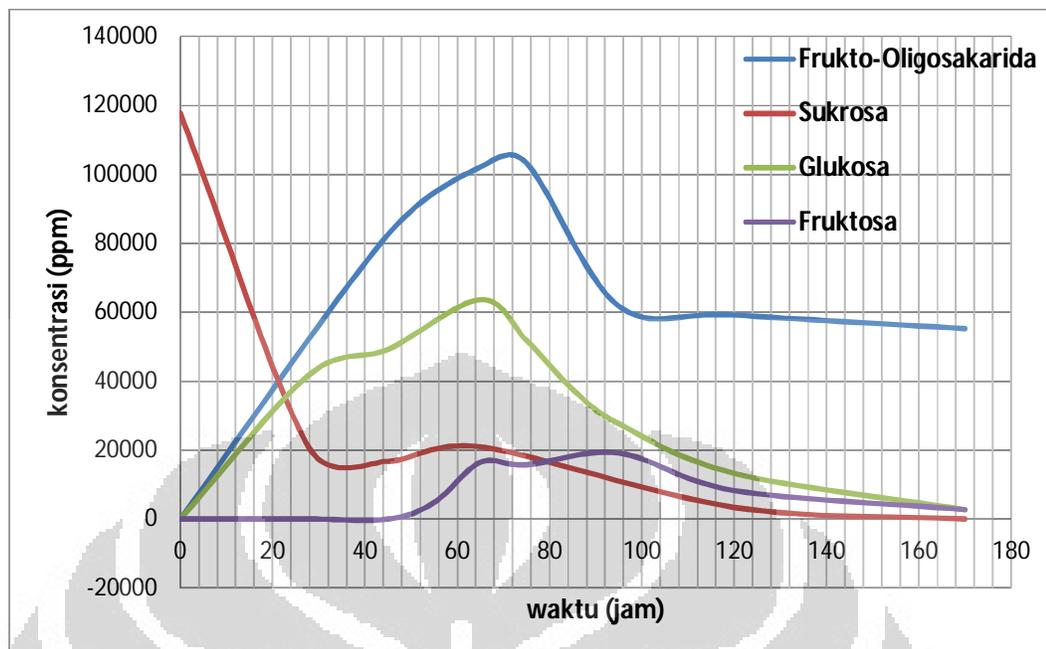
Sumber : Yun, 1996

Gambar 4.5. Reaksi umum pembentukan FOS dengan enzim

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.

FOS yang terbentuk diukur berdasarkan luas area puncak-puncak yang terbentuk pada HPLC. Berdasarkan larutan FOS standar, maka puncak FOS akan berada pada waktu retensi sekitar 4,0. Namun dari data HPLC pada beberapa variasi waktu, ditemukan dua jenis puncak di sekitar waktu retensi 4,0 menit, yakni pada waktu 4,3 menit dan 4,6 menit. Perbedaan waktu retensi FOS tersebut bergantung pada jumlah monomer pembentuknya. 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. Kemungkinan FOS hasil fermentasi pada penelitian ini memiliki jumlah monomer yang lebih sederhana dari FOS standar, karena memiliki nilai waktu retensi yang lebih besar dari standarnya.

Selama fermentasi, jumlah FOS akan terus meningkat diiringi dengan penurunan jumlah sukrosa karena FOS dibentuk dari monomer-monomer hasil hidrolisis sukrosa. FOS sudah mulai terbentuk sejak waktu fermentasi 28 jam, namun jumlahnya belum mencapai optimal. FOS dihasilkan dalam jumlah besar pada waktu fermentasi antara 70-75 jam. Hal ini sesuai dengan penelitian terdahulu (Rifan, 2011) tentang pertumbuhan pada *Pencillium notatum* yang menyatakan bahwa kapang tersebut memiliki jumlah optimum pada waktu 72 jam. Dengan jumlah yang optimum dari mikroorganismenya, maka produksi FOS juga bisa optimum. Perubahan konsentrasi sukrosa, glukosa, fruktosa, dan FOS selama fermentasi bisa dilihat pada gambar 4.6.



Gambar 4.6. Kurva konsumsi sukrosa dan produksi glukosa, fruktosa, dan FOS selama fermentasi

Fermentasi di atas 75 jam menghasilkan jumlah FOS yang semakin menurun karena saat itu sukrosa telah habis dan FOS kemungkinan dihidrolisis kembali untuk digunakan sebagai nutrisi *Penicillium notatum*. Di penelitian terdahulu dikatakan bahwa ketika jumlah sukrosa telah habis di medium, mikroorganisme mulai mengonsumsi FOS yang dihasilkannya (Prata, 2010), sehingga nantinya jumlah FOS pun akan menurun.

Berbeda dengan glukosa, di awal fermentasi konsentrasi fruktosa sangat sedikit, bahkan hampir tidak ada. Padahal sukrosa akan terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa yang seharusnya menjadikan jumlah glukosa dan fruktosa sama banyak. Lebih rendahnya jumlah fruktosa dari jumlah glukosa ini kemungkinan bisa mengindikasikan bahwa produk yang terbentuk memakai lebih banyak fruktosa daripada glukosa, sehingga bisa disimpulkan sementara bahwa benar jenis oligosakarida yang dihasilkan adalah FOS.

Jumlah glukosa yang terus meningkat akan menginhibisi enzim β -fruktofuranosidase sehingga reaksi transfer gugus fruktosil tidak terjadi, dan reaksi akan cenderung menjadi hidrolisis (Rifan,2011). Hal ini juga yang mungkin menyebabkan meningkatnya jumlah fruktosa dan menurunnya jumlah FOS yang dihasilkan.

4.7 Identifikasi Produk FOS

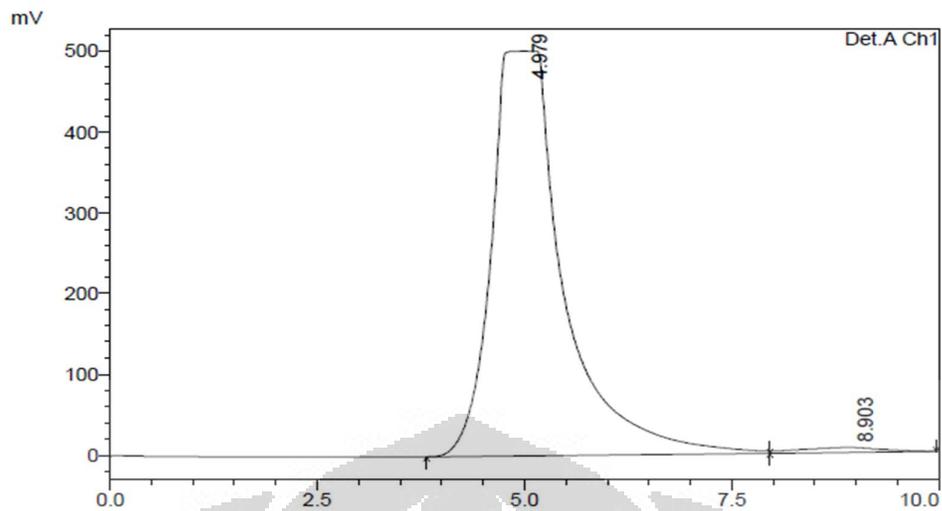
Tujuan dari penelitian ini adalah mengidentifikasi FOS yang diproduksi dari fermentasi sukrosa oleh *Penicillium notatum*. Identifikasi yang dilakukan berdasarkan atas monomer-monomer penyusun FOS tersebut. Untuk sampai tahap identifikasinya, maka dilakukan perbanyak FOS hingga cukup untuk diisolasi dan diidentifikasi. FOS diperbanyak dengan melakukan fermentasi sampai waktu optimum dihasilkannya FOS, yaitu 75 jam.

Fermentasi dilakukan hingga 75 jam, kemudian diisolasi dan dimurnikan dari glukosa, fruktosa, dan sukrosa yang kemungkinan ada di dalam medium, sehingga nantinya yang akan dianalisis lebih lanjut hanya senyawa FOS.



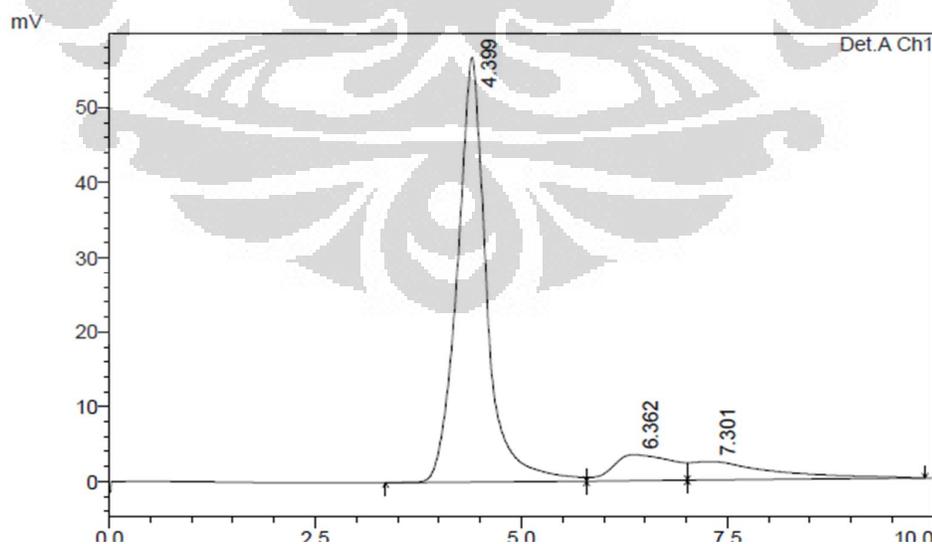
Gambar 4.7. Foto produk FOS setelah diisolasi

FOS yang telah diisolasi kemudian di hidrolisis dengan HCl agar oligosakarida tersebut terdegradasi menjadi monomer penyusunnya, fruktosa dan glukosa. Berdasarkan teori-teori yang ada, FOS minimal terdiri dari 1 molekul glukosa dan 2 molekul fruktosa (GF₂). Dari jumlah minimal monomernya saja bisa dilihat bahwa konsentrasi fruktosa akan lebih banyak dari konsentrasi glukosa dalam susunan molekul senyawa FOS. Seharusnya ketika FOS dihidrolisis dan hidrolisatnya disuntikkan ke HPLC, luas puncak untuk senyawa fruktosa akan lebih besar dibandingkan dengan luas puncak milik glukosa.



Gambar 4.8. Kromatogram Isolasi Produk FOS

Gambar 4.8 merupakan kromatogram dari isolasi FOS. Puncak yang dihasilkan berada pada waktu retensi 4,9 menit yang kemungkinan merupakan senyawa FOS. FOS dihidrolisis dan hasil kromatogramnya dapat dilihat pada gambar 4.6. dari gambar 4.4 terdapat 3 puncak, yakni pada waktu retensi 4,3 menit; 6,3 menit; dan 7,3 menit. Kemungkinan tiga senyawa tersebut adalah FOS yang belum terhidrolisis, glukosa dan fruktosa hasil hidrolisis. Tidak sepenuhnya hidrolisis yang terjadi mungkin disebabkan kurang pekatnya asam yang digunakan dan kurang lamanya waktu pemanasan yang dilakukan untuk menghidrolisis FOS.



Gambar 4.9. Kromatogram dari isolat produk FOS yang dihidrolisis

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian karakterisasi FOS dengan memfermentasikan sukrosa oleh *Penicillium notatum*, disimpulkan bahwa :

1. Analisis dengan HPLC diperoleh puncak produk FOS hasil fermentasi pada waktu retensi 4,3 dan 4,6 menit.
2. Waktu optimum untuk memproduksi FOS dari fermentasi sukrosa adalah 70-75 jam.
3. Terdapat pengurangan jumlah sukrosa yang bersamaan dengan penambahan jumlah glukosa dan fruktosa seiring bertambahnya waktu fermentasi.
4. Dari hasil hidrolisis isolat FOS, dapat diidentifikasi senyawa FOS terhidrolisis menjadi glukosa dan fruktosa dengan waktu retensi 6,3 menit dan 7,3 menit.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, maka diusulkan penelitian lanjutan :

1. Perlu digunakan standar FOS dengan jenis yang lebih bervariasi, sehingga identifikasi senyawa tersebut bisa lebih spesifik.
2. Perlu dilakukan penelitian tentang metode dalam menghidrolisis FOS dengan konsentrasi asam dan waktu pemanasan yang tepat, sehingga FOS tersebut dapat terhidrolisis sempurna.
3. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mencari ikatan glikosidik dalam senyawa FOS yang dihasilkan dari fermentasi ini.

DAFTAR PUSTAKA

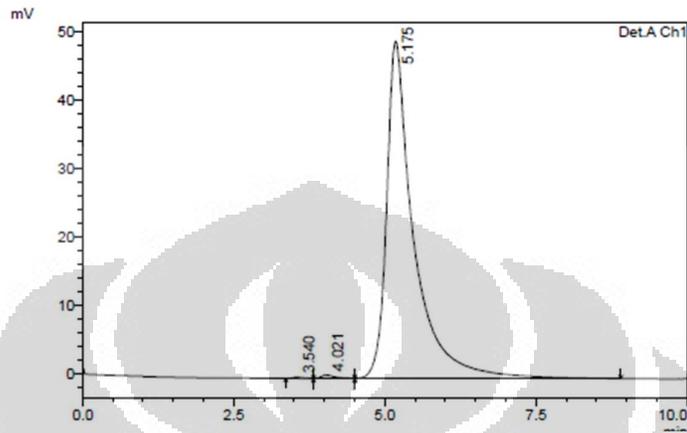
- Çaglar, E., Kargul. B., & Tanboga. I. (2005). *Bacteriotherapy and Probiotics Role on Oral Health*. Review Article Blackwell Munksgaard, 11. Pp. 131-136.
- Cappucino, J.G and N.Sherman. (2001). *Microbiology: A Laboratory manual*. 4th, ed. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc, San Fransisco: xvi+491 hlm.
- Demuth, Kristin, dkk. (2002). *Oligosaccharides synthesis by dextransucrase: new unconventional acceptors*. Carbohydrate Research, 337:1811-1820.
- 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/wiki/File:Penicillium_notatum.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Penicillium_notatum.jpg)
- [Http://wong168.wordpress.com/2011/04/30/perbedaan-minuman-probiotik-dan-prebiotik](http://wong168.wordpress.com/2011/04/30/perbedaan-minuman-probiotik-dan-prebiotik). (Diakses pada 26 Desember 2011, pukul 16.12)
- Kennedy, J.F., D.L. Stevenson, C.A. White, L. Viikari. (1989). *The chromatographic behavior of a series of fructooligosaccharides derived from levan produced by the fermentation of sucrose by Zymomonas mobilis*. Carbohydrate Polymers, 10:103-113.
- Kolida, S., K. Tuohy and G. R. Gibson. (2002). *Prebiotic effects of inulin and oligofructose*. British Journal of Nutrition, 87: S193–S197.
- Kurakake, M. and Onoue, Komaki. (1995). *Effect of pH on transfructosylation and hydrolysis by β -fructofuranosidase from Aspergillus oryzae*. Appl Microbiol Biotechnol 45:236-239.

- Lee ,Jae Heung dan Satoru Shinohara. (2001). *Reaction Route for Enzymatic Production of Neofructo-oligosaccharides from Sucrose Using Penicillium citrinum Cells*. The Journal of Microbiology, 39:331-333.
- Llyod, L.L., C.J. Knill, J.F. Kennedy, D.A.J. Wase, (1994). *Identification of the fructo-oligosaccharides common to beet medium invert sugar and pyrolysed sucrose*. Carbohydrate Polymers, 25:85-93.
- Maiorano, E.M., R.M. Piccoli, E.S. da Silva, M.F.A Rodrigues. (2008). *Microbial production of fructosyltransferase for synthesis of pre-biotics*. Biotechnol Lett, 30:1867-1877.
- Murniasih, Tutik. (2010). "Frukto-Oligosakarida (FOS) dan Galaktosakarida (GOS) Sebagai *Functional Food*".
- Mussatto, S.I., Aguilar, dkk. (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.
- Rifan. (2011). *Sintesis Frukto-oligosakarida (FOS) dari sukrosa dengan menggunakan Penicillium notatum*. Karya Utama Sarjana Kimia FMIPA UI Depok.
- Ronkart ,S.N., C.S. Blecker, H. Fourmanoir, C. Fougnes, C. Deroanne, J.C. Van Herck, M. Paquot. (2007). *Isolation and identification of inulooligosaccharides resulting from inulin hydrolysis*. Analytica Chimica Acta, 6 0 4: 81–87.

- Saepudin, Endang dan Siswati Setiasih. (2005). Bioteknologi. Depok : Departemen Kimia FMIPA UI.
- 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.
- Setiasih, Siswati, S. Handayani, Susilowati H.S., E. Saepudin. (2006). *Penuntun praktikum mikrobiologi*. Depok : Departemen Kimia FMIPA UI.
- Seo, Eun-Seong, J.H. Lee, J.Y. Cho, M.Y. Seo, H.S. Lee, S.S. Chang, H.J. Lee, J.S. Choi, dan Doman Kim. (2004). *Synthesis and characterization of fructooligosaccharides using levansucrase with a high concentration of sucrose*. Biotechnology and Bioprocess Engineering., 9:339-340.
- Sunardi. (2007). *Penuntun praktikum kimia analisa instrumentasi*. Depok : Departemen Kimia FMIPA UI.
- Surati, Sri.(2007). *Penapisan kandungan β -1,3-glukan dan isolasi ekstrapolisakarida (EPS) dari strain khamir genus Cryptococcus (Vuillemin)*. Karya Utama Sarjana Biologi FMIPA UI Depok.
- Wahlqvist, M. (2002). *Prebiotics and Probiotics*.
<<http://www.healthyeatingclub.org>. >
- Wight, A.W., P.J. van Niekerk. (1982). *A sensitive and selective method for the determination of reducing sugars and sucrose in food and plant material by High Performance Liquid Chromatography*. Food Chemistry, 10:211-224.
- Yahya, Harun. (2005). Cairan Ajaib : Air Susu Ibu. Diakses 24 September 2011, pukul 06.09. <<http://www.harunyahya.com/indo/artikel/082.htm>>
- Yun, Jong Won. (1996). *Fructooligosaccharides-Occurence, preparations, and applications*. Elsevier Science Inc.

Lampiran 1 : Kromatogram Larutan Standar Sukrosa

1) Sukrosa 10.000 ppm

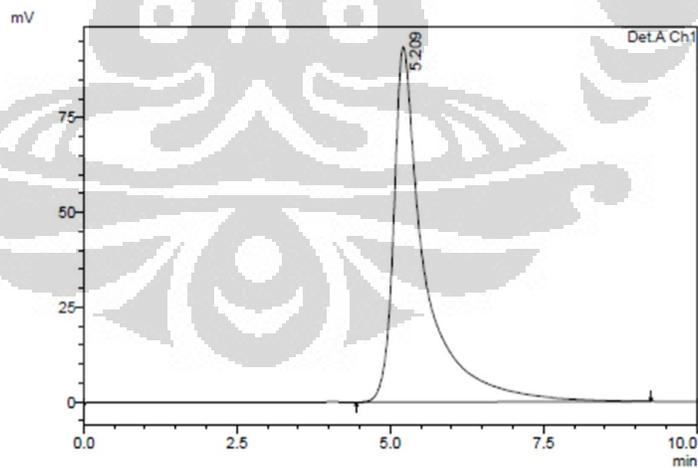


Detector A Ch1

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	3.540	2694	208	0.172	0.417	1836.843
2	4.021	8483	497	0.542	0.995	1472.338
3	5.175	1554201	49278	99.286	98.588	945.481
Total		1565377	49983	100.000	100.000	

2) Sukrosa 25.000 ppm



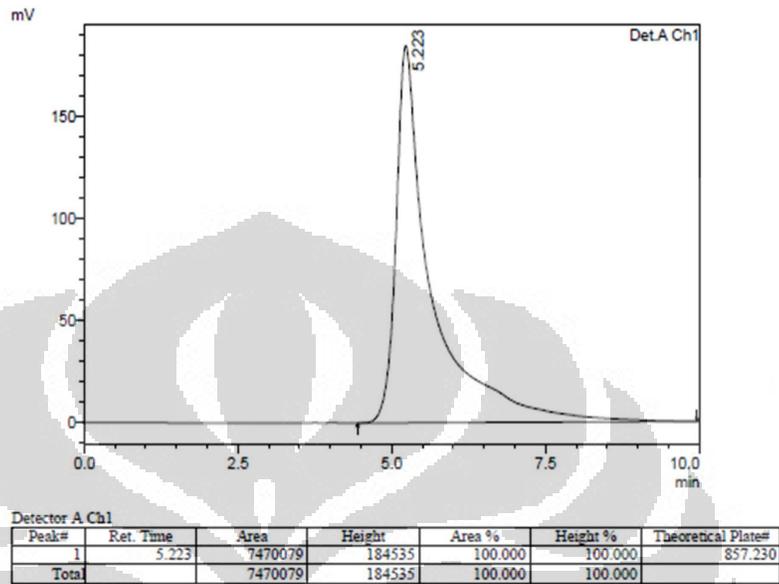
Detector A Ch1

PeakTable

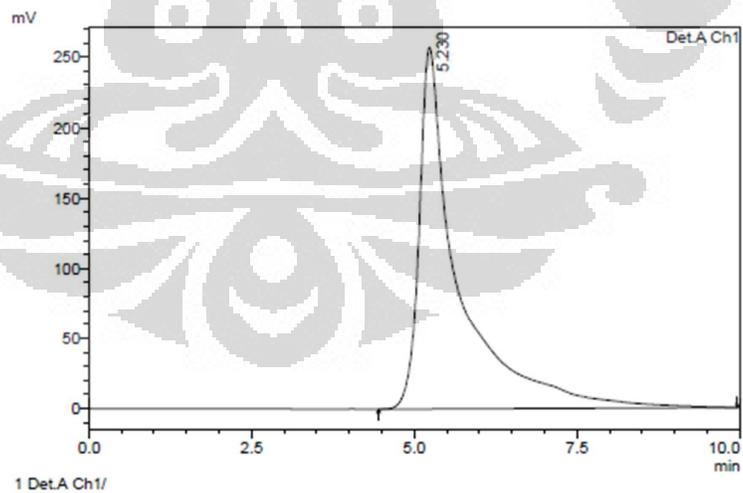
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	5.209	3331328	93599	100.000	100.000	879.518
Total		3331328	93599	100.000	100.000	

(Lanjutan)

3) Sukrosa 50.000 ppm



4) Sukrosa 75.000 ppm



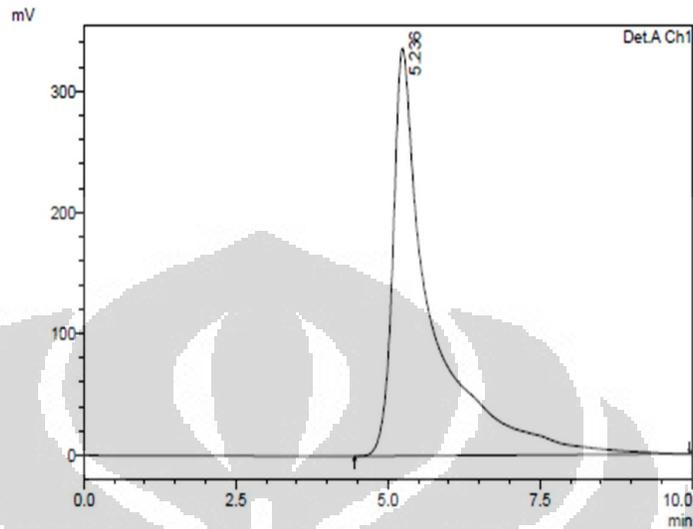
<Results>

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	5.230	10879492	256911	100.000	100.000	873.122
Total		10879492	256911	100.000	100.000	

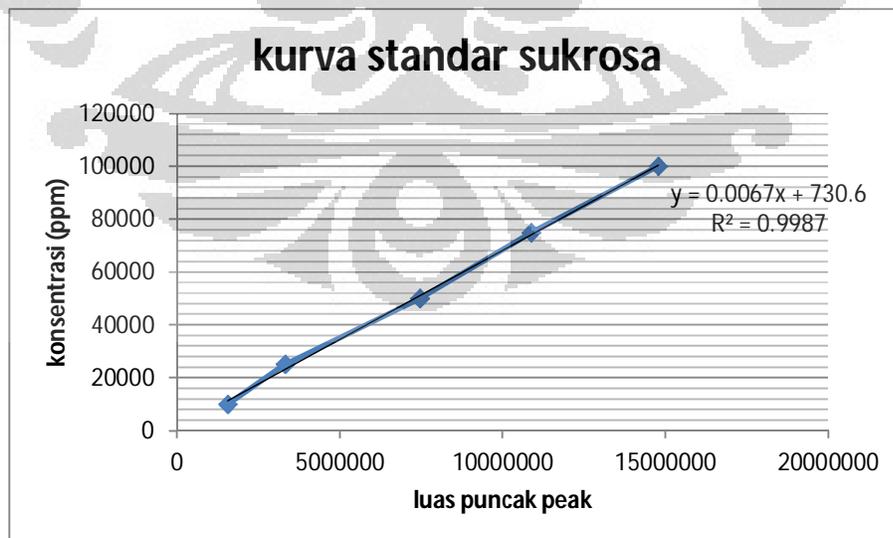
(Lanjutan)

5) Sukrosa 100.000 ppm



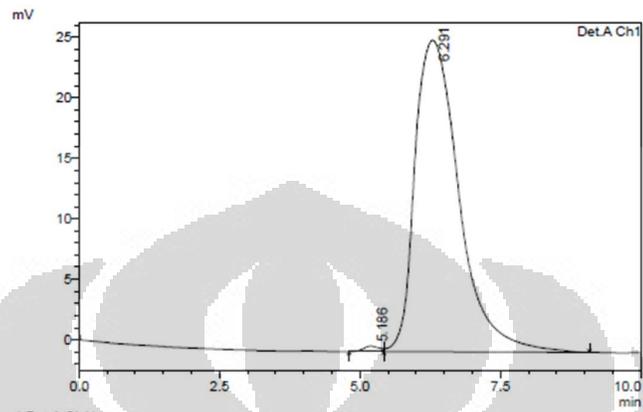
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	5.236	14775808	335596	100.000	100.000	843.122
Total		14775808	335596	100.000	100.000	

6) Kurva Standar Sukrosa



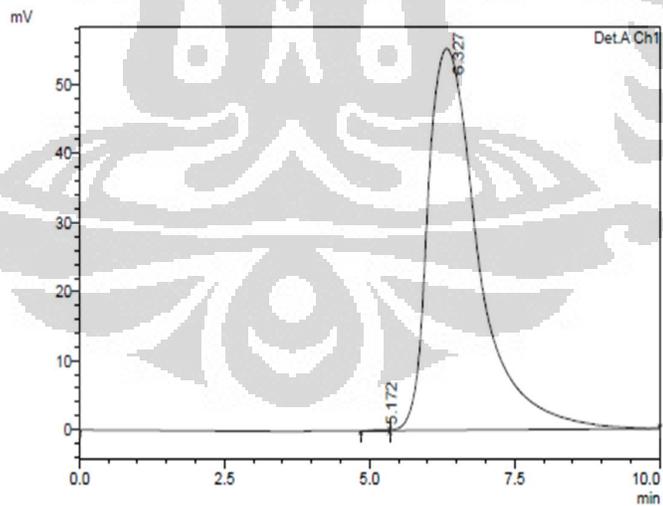
Lampiran 2 : Kromatogram Larutan Standar Glukosa

1) Glukosa 10.000 ppm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	5.186	9065	456	0.638	1.740	1111.909
2	6.291	1412591	25737	99.362	98.260	384.387
Total		1421656	26193	100.000	100.000	

2) Glukosa 25.000 ppm

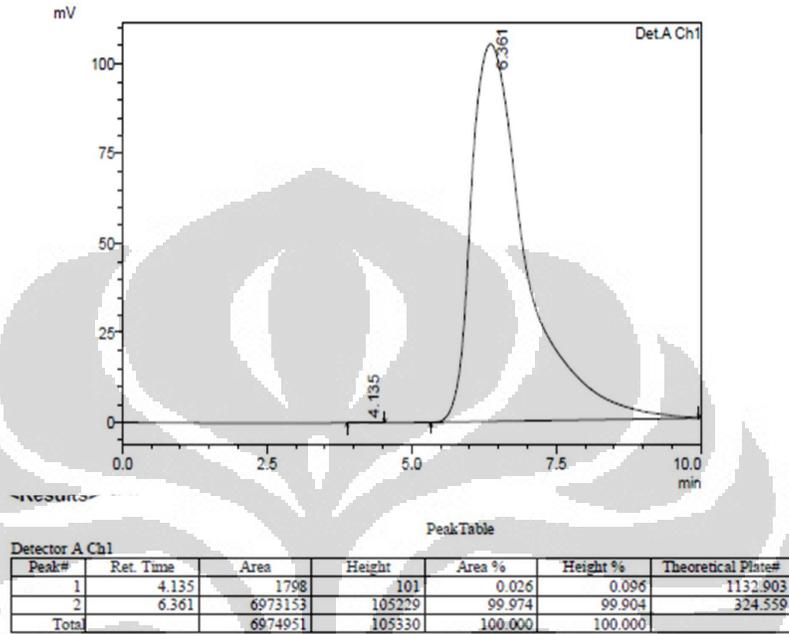


PeakTable

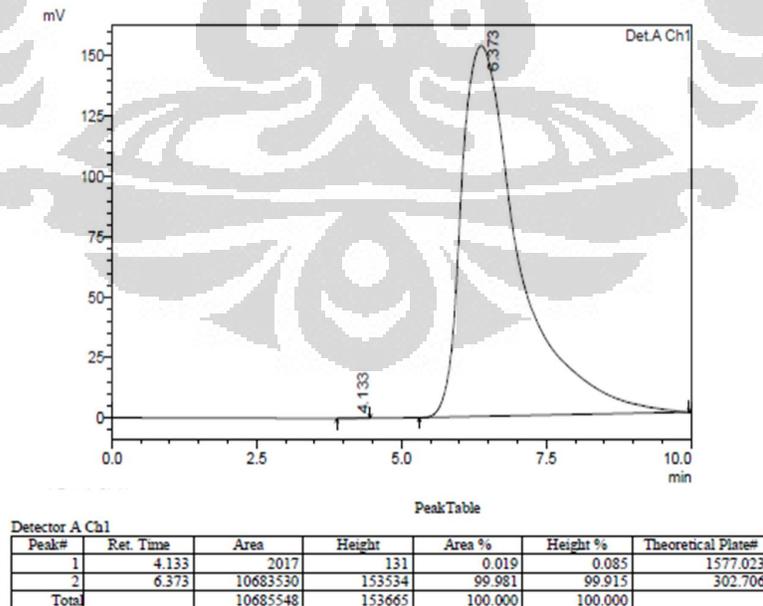
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	5.172	2540	146	0.076	0.265	1108.911
2	6.327	3349512	55202	99.924	99.735	345.597
Total		3352052	55348	100.000	100.000	

(Lanjutan)

3) Glukosa 50.000 ppm

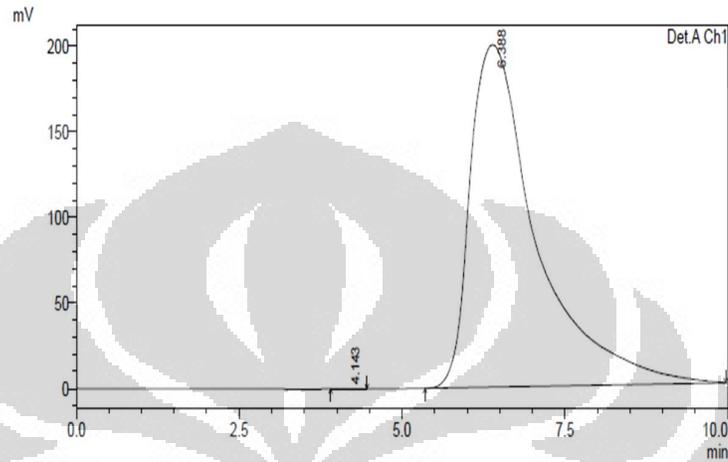


4) Glukosa 75.000 ppm



(Lanjutan)

5) Glukosa 100.000 ppm

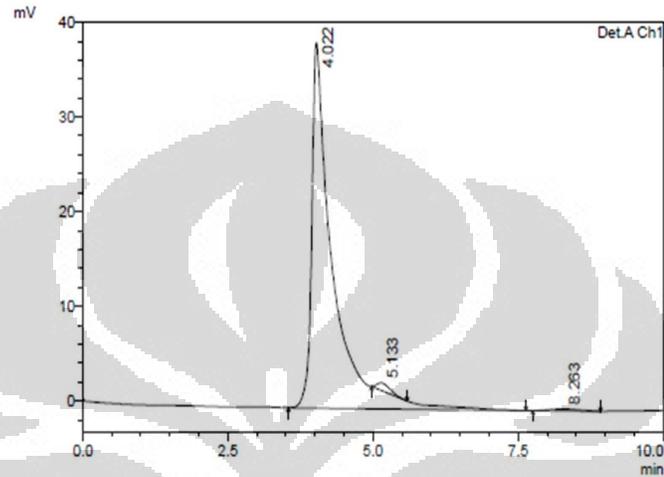


6) Kurva Standar Glukosa



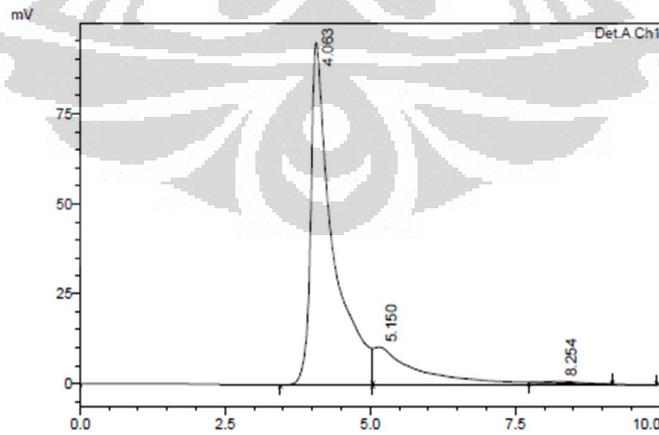
Lampiran 3 : Kromatogram Larutan Standar FOS

1) FOS10.000 ppm



Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	4.022	970658	38576	97.857	97.459	1137.069
2	5.133	12986	777	1.309	1.964	2193.365
3	8.263	8268	228	0.834	0.577	997.954
Total		991913	39581	100.000	100.000	

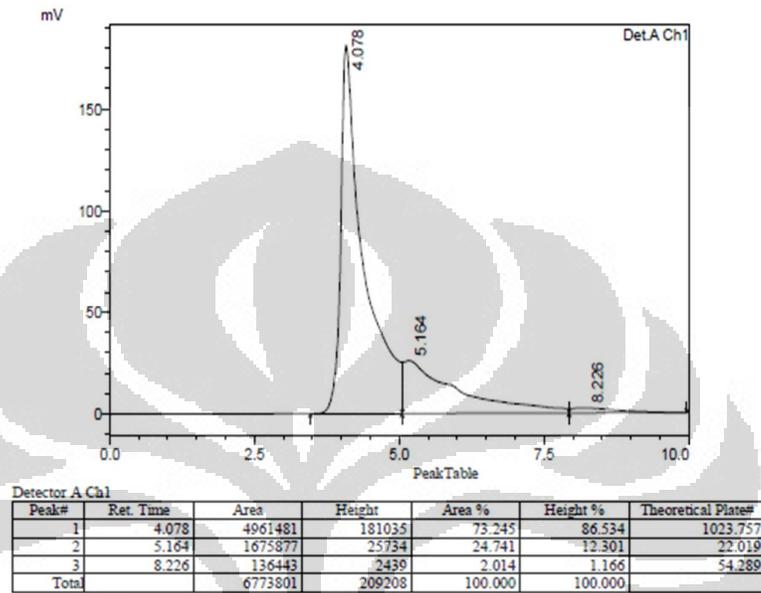
2) FOS 25.000 ppm



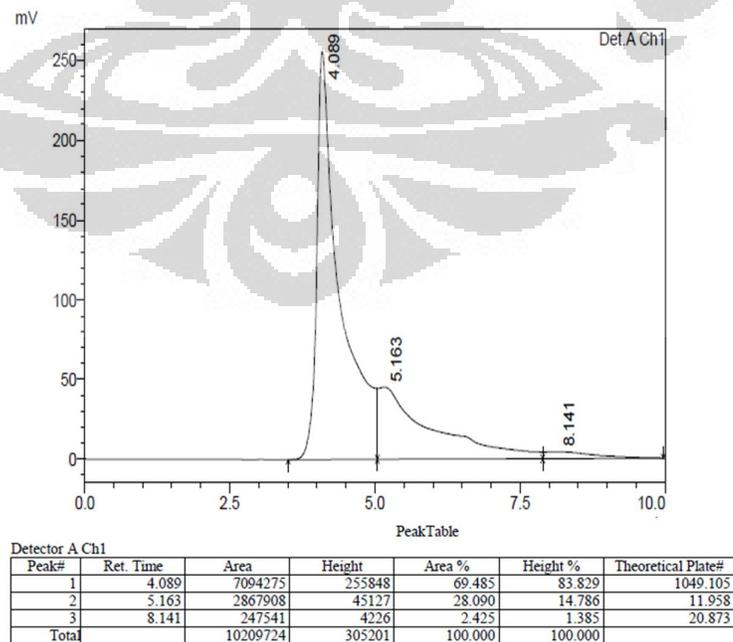
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	4.063	2513769	94797	80.516	89.682	912.552
2	5.150	589943	10424	18.896	9.862	31.601
3	8.254	18372	483	0.588	0.457	960.466
Total		3122084	105704	100.000	100.000	

(Lanjutan)

3) FOS 50.000 ppm

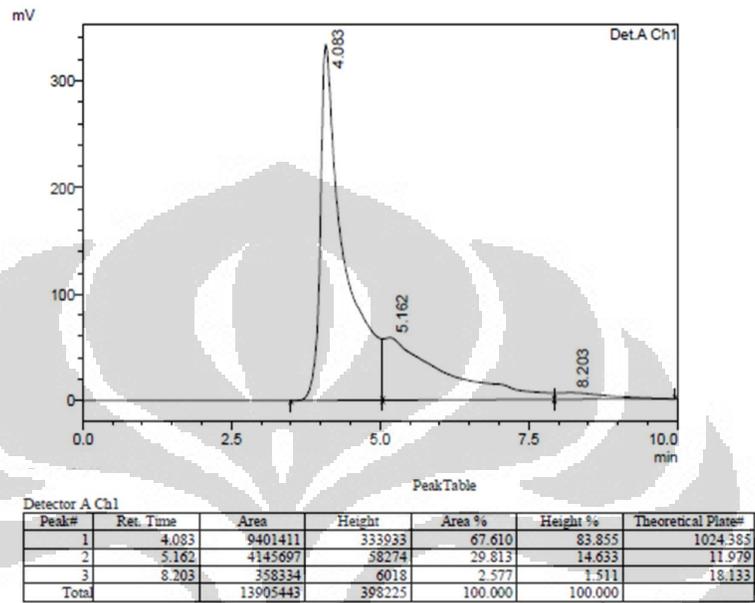


4) FOS 75.000 ppm

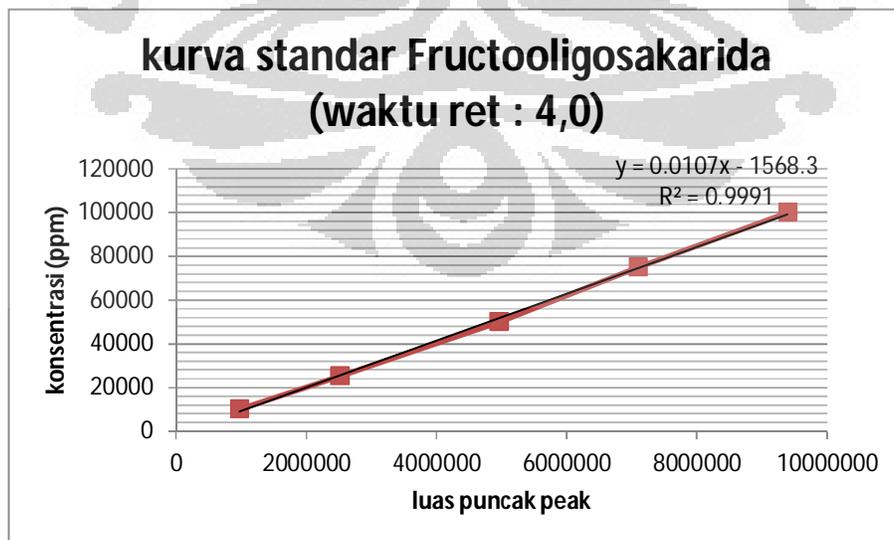


(Lanjutan)

5) FOS 100.000 ppm

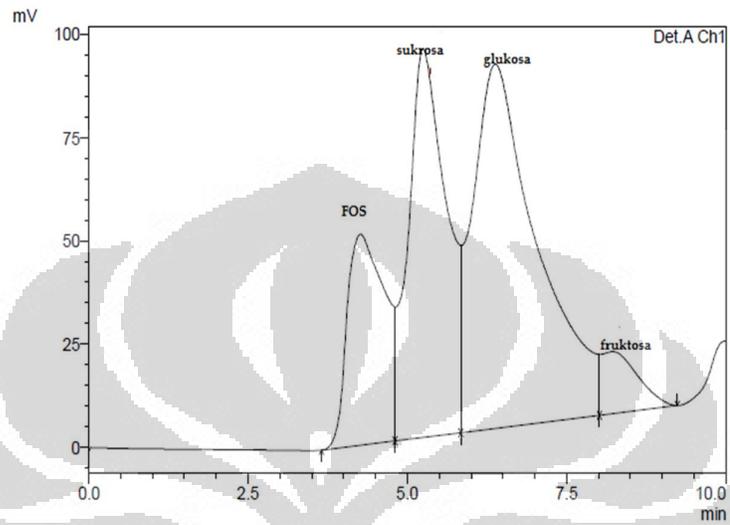


6) Kurva Standar FOS

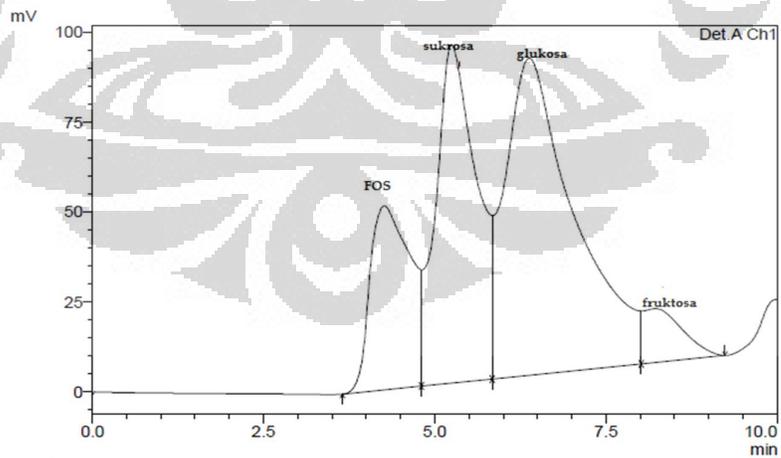


Lampiran 4: Kromatogram Larutan Sukrosa, Glukosa, dan FOS

1) Larutan Standar Sukrosa, Glukosa, fruktosa, dan FOS

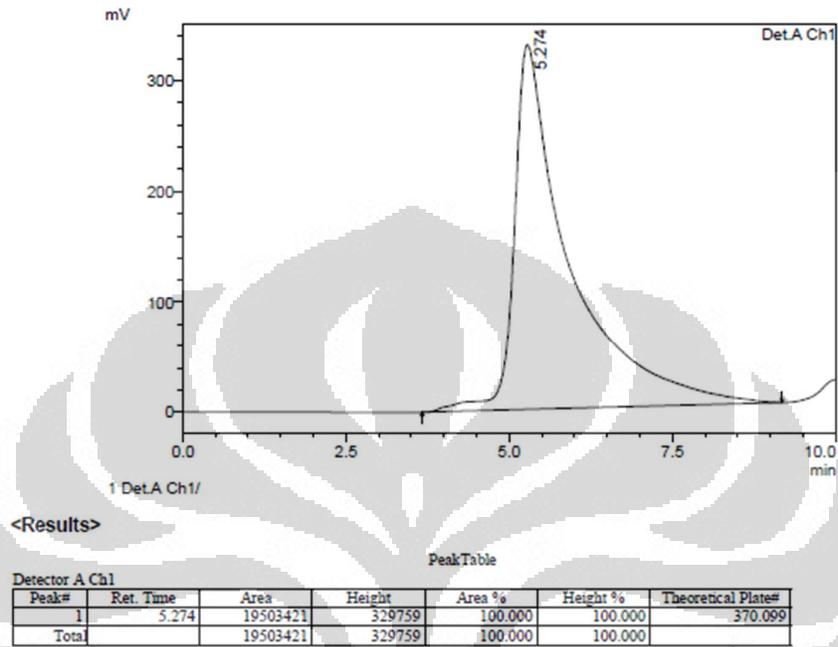


2) Larutan Standar dan Medium Setelah Fermentasi

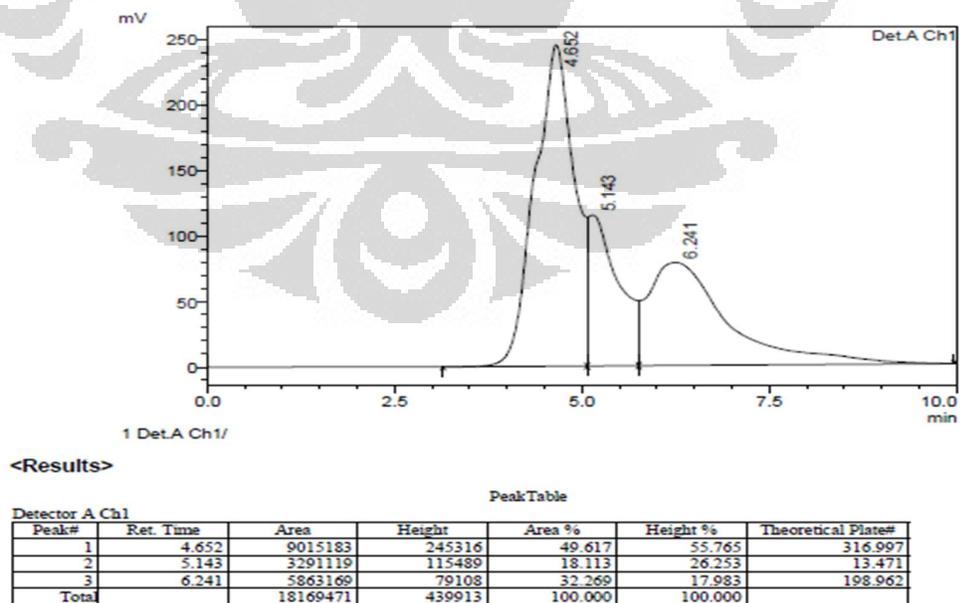


Lampiran 5 : Kromatogram Hasil Fermentasi Sukrosa 20%

1) 0 Jam

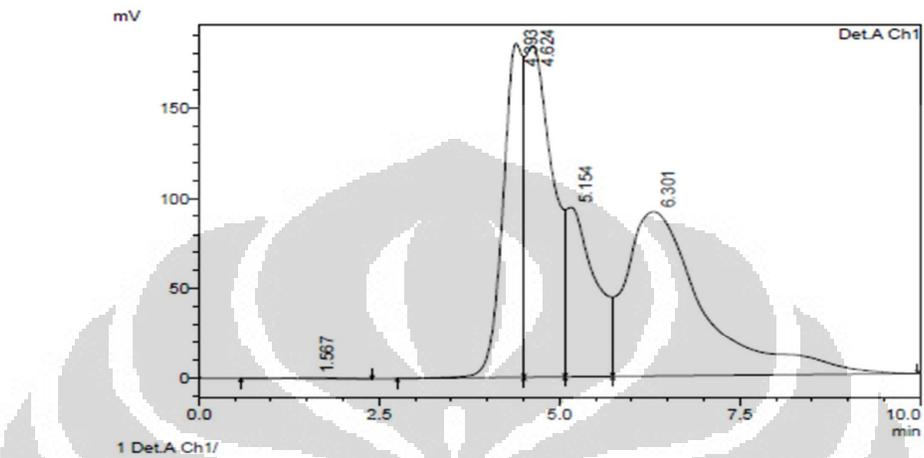


2) 28 Jam



(Lanjutan)

3) 45 Jam

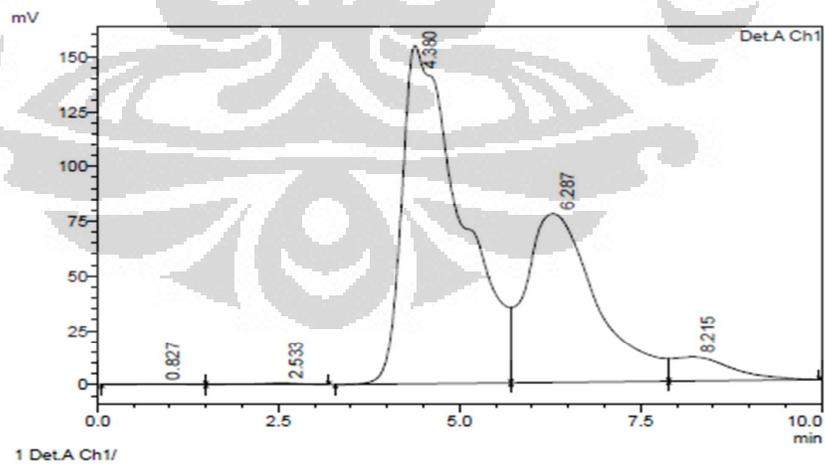


<Results>

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	1.567	26877	663	0.149	0.120	37.638
2	4.393	3574966	184951	19.845	33.326	56.532
3	4.624	4833981	183734	26.834	33.107	37.101
4	5.154	2673462	94253	14.841	16.983	14.111
5	6.301	6905268	91371	38.332	16.464	236.157
Total		18014554	554973	100.000	100.000	

4) 55 Jam



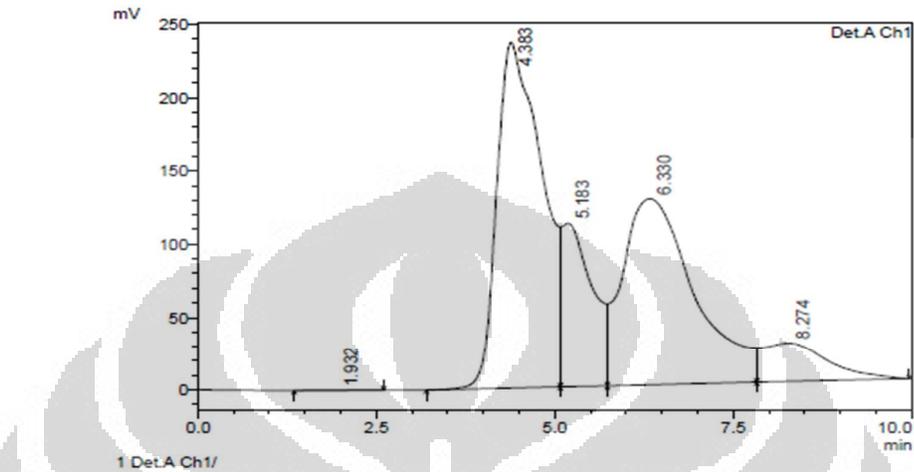
<Results>

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	0.827	14972	355	0.102	0.145	9.351
2	2.533	32299	773	0.220	0.317	109.333
3	4.380	8787281	154633	59.820	63.386	221.498
4	6.287	5236359	77291	35.647	31.682	249.302
5	8.215	618640	10904	4.211	4.469	46.807
Total		14689551	243956	100.000	100.000	

(Lanjutan)

5) 65 Jam

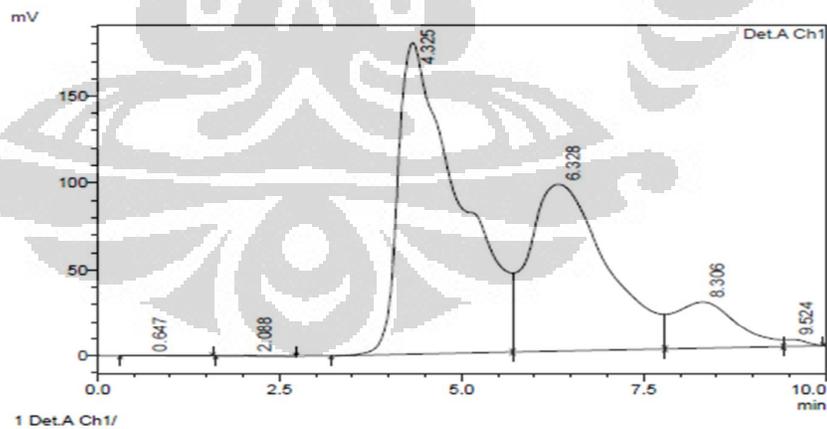


<Results>

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	1.932	7795	234	0.032	0.047	75.664
2	4.383	10370035	236424	42.475	47.034	188.717
3	5.183	3366961	111967	13.791	22.274	19.742
4	6.330	8963192	127597	36.712	25.384	234.444
5	8.274	1706616	26449	6.990	5.262	78.215
Total		24414600	502671	100.000	100.000	

6) 75 Jam



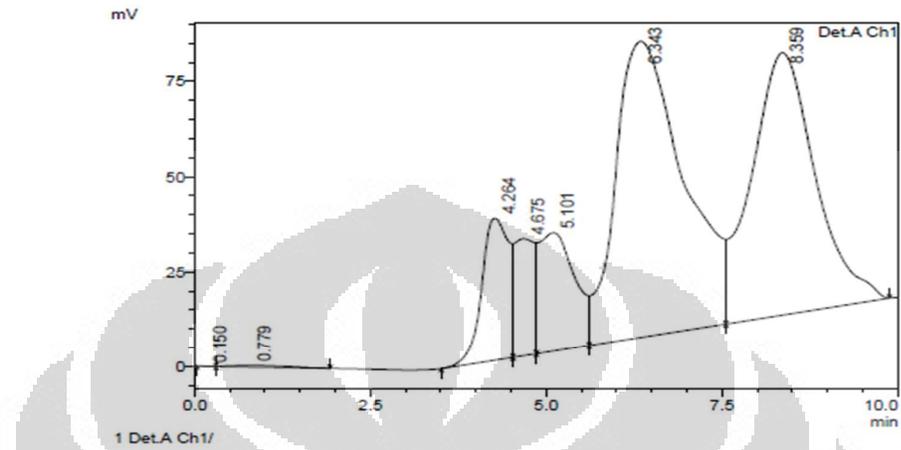
<Results>

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	0.647	8431	196	0.043	0.064	4.341
2	2.088	7659	257	0.039	0.083	104.782
3	4.325	10485597	179653	53.774	58.349	161.615
4	6.328	7272608	96597	37.297	31.373	194.176
5	8.306	1642739	27131	8.425	8.812	207.831
6	9.524	82183	4062	0.421	1.319	14.800
Total		19499218	307896	100.000	100.000	

(Lanjutan)

7) 85 Jam



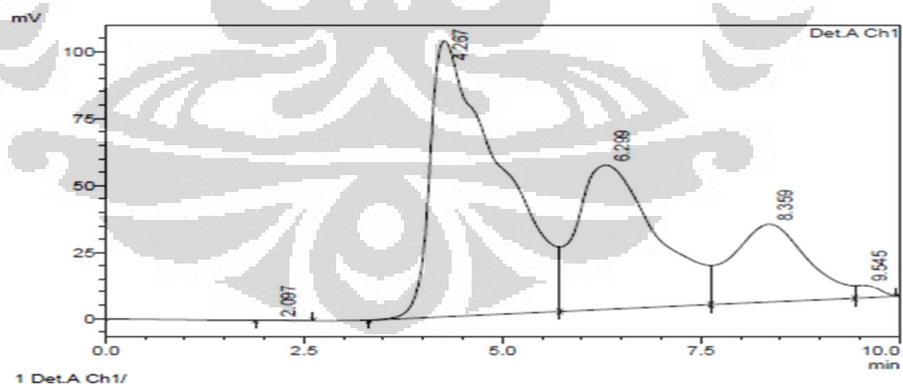
<Results>

Detector A Ch1

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	0.150	1024	69	0.008	0.028	0.000
2	0.779	26360	488	0.214	0.198	4.090
3	4.264	1009376	37461	8.180	15.187	207.059
4	4.675	605208	30889	4.904	12.523	10.173
5	5.101	1098396	31141	8.901	12.625	55.010
6	6.343	5242613	77769	42.485	31.529	263.169
7	8.359	4356977	68843	35.308	27.910	410.104
Total		12339953	246660	100.000	100.000	

8) 95 Jam



<Results>

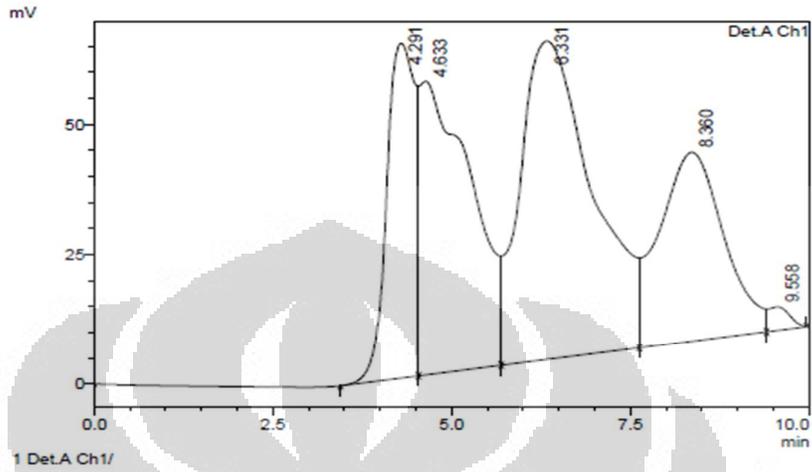
Detector A Ch1

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	2.097	2005	79	0.016	0.041	179.237
2	4.267	6337598	103203	51.869	53.797	117.163
3	6.299	3819912	54180	31.264	28.243	216.932
4	8.359	1962124	29397	16.059	15.324	306.664
5	9.545	96721	4978	0.792	2.595	14.838
Total		12218360	191837	100.000	100.000	

(Lanjutan)

9) 120 Jam



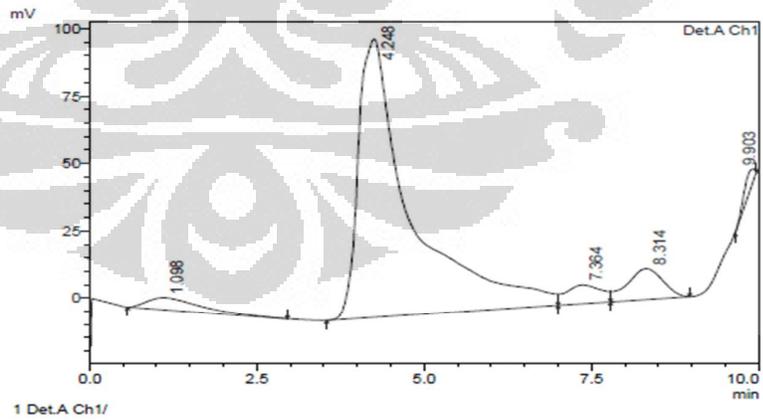
<Results>

Detector A Ch1

PeakTable

Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	4.291	1780386	64354	15.738	28.881	133.076
2	4.633	2816964	56464	24.901	25.340	9.935
3	6.331	4327479	61194	38.254	27.463	235.209
4	8.360	2295298	36296	20.290	16.289	355.419
5	9.558	92498	4518	0.818	2.028	171.681
Total		11312626	222826	100.000	100.000	

10) 170 Jam



<Results>

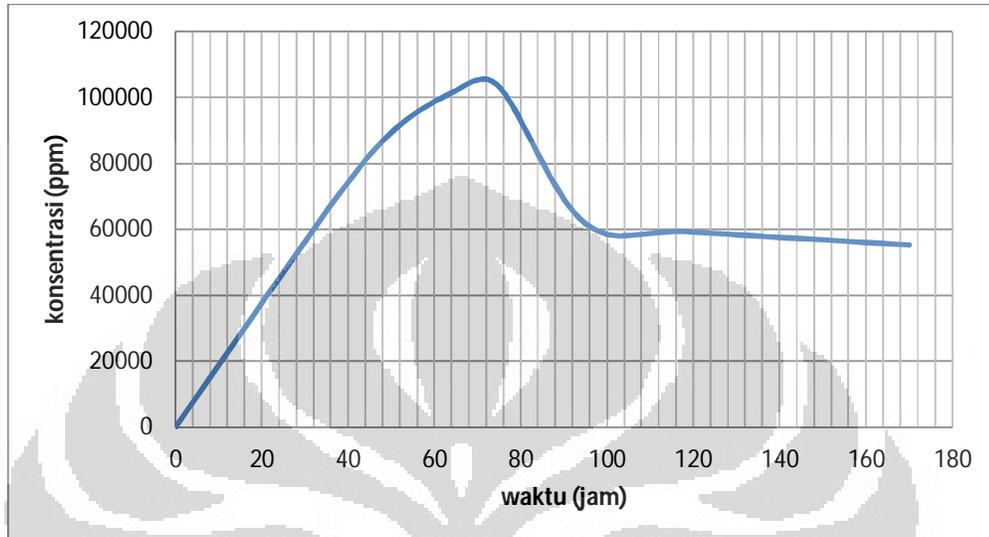
Detector A Ch1

PeakTable

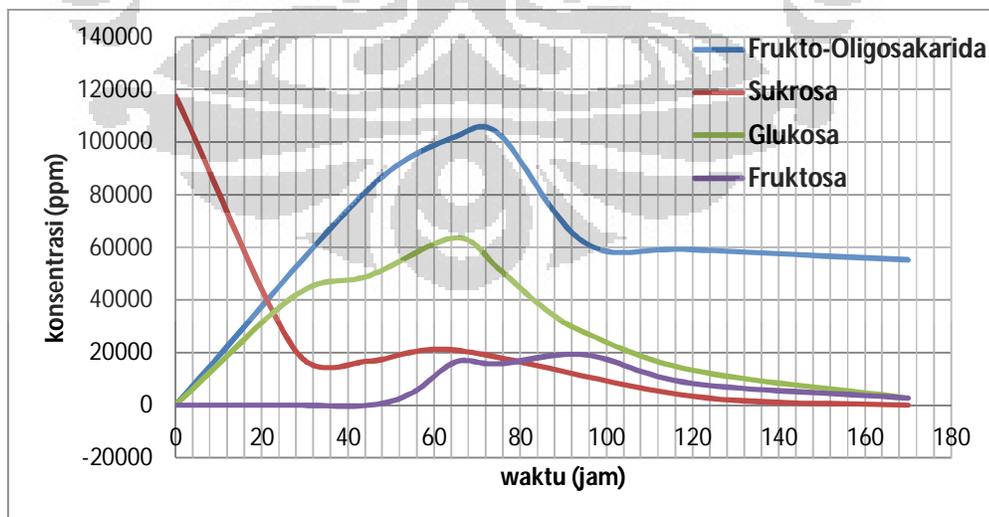
Peak#	Ret. Time	Area	Height	Area %	Height %	Theoretical Plate#
1	1.098	248031	4481	3.704	3.399	9.178
2	4.248	5682110	103417	84.851	78.435	321.379
3	7.364	257509	6991	3.845	5.302	512.577
4	8.314	426969	11503	6.376	8.724	1124.922
5	9.903	81965	5458	1.224	4.139	20986.589
Total		6696585	131850	100.000	100.000	

(Lanjutan)

11) Kurva produksi FOS selama fermentasi

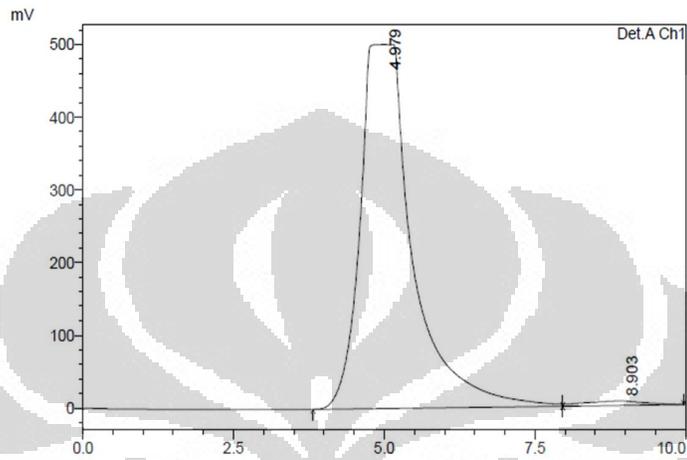


12) Kurva konsumsi Sukrosa dan produksi glukosa, fruktosa, dan FOS selama fermentasi



Lampiran 6: Kromatogram hasil isolasi dan hidrolisis FOS

1) Isolat FOS



2) Hidrolisat FOS

