

PRODUKSI ALGINATE OLIGOSACCHARIDES (AOS) SEBAGAI BAHAN PREBIOTIK MENGGUNAKAN ENZIM ALGINAT LIASE

Production of Alginate Oligosaccharides (AOS) as Prebiotic Ingredients through by Alginate lyase enzyme

Fahriza Sri Afni^{1*}, Sri Purwaningsih¹, Mala Nurilmala¹, Rosmawati Peranginangin²

¹Departemen Teknologi Hasil Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Jalan Agatis, Bogor 16680 Jawa Barat
Telepon (0251) 8622915, Faks (0251) 8622916

²Pusat Penelitian dan Pengembangan Daya Saing Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, KKP,
Jl. K.S. Tubun Petamburan VI, Jakarta Pusat 10260

*Korespondensi: fahrizasriafni0807@gmail.com

Diterima: 27 Januari 2017/ Disetujui: 17 April 2017

Cara sitasi: Afni FS, Purwaningsih S, Nurilmala M, Peranginangin. 2017. Produksi *alginate oligosaccharides* (AOS) sebagai bahan prebiotik menggunakan enzim alginat liase. *Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*. 20(1): 109-122.

Abstrak

Prebiotik merupakan bahan makanan yang tidak dapat dicerna tetapi dapat menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas bakteri di dalam sistem pencernaan. *Alginate oligosaccharides* (AOS) dapat digunakan sebagai sumber prebiotik. Senyawa tersebut dapat dihasilkan secara enzimatik dengan memotong rantai panjang alginat menggunakan alginat liase. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan enzim alginat liase yang digunakan untuk memproduksi AOS sebagai bahan prebiotik. Enzim alginat liase dapat dihasilkan dari bakteri *Bacillus megaterium* menggunakan fermentor diskontinu. Enzim tersebut memiliki suhu optimum 45°C dan pH optimum 7,0. Produksi AOS dilakukan menggunakan enzim dengan aktivitas 25, 50, 75, dan 100 U. Hasil penelitian menunjukkan bahwa AOS yang diproduksi menggunakan enzim dengan aktivitas 25, 50 dan 75 U menunjukkan derajat polimerisasi (DP) 4-5, sedangkan yang menggunakan enzim dengan aktivitas 100 U menunjukkan DP 3-4. Hasil uji pertumbuhan bakteri probiotik *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* menunjukkan bahwa media yang ditambahkan perlakuan AOS sebanyak 1% mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik dibandingkan pada media tanpa penambahan AOS. Aktivitas enzim yang ditambahkan sebanyak 50 U dalam produksi AOS merupakan perlakuan terbaik dari kedua bakteri probiotik.

Kata kunci: alginat, fermentor, probiotik

Abstract

Prebiotic is indigestible food that stimulate the growth and activity of bacteria in the digestive tract effecting human health. Alginate oligosaccharides (AOS) can be used as a source of prebiotic. AOS can be produced enzymatically by cutting long chain alginates using alginate lyase enzyme. The aim of this study was to produce alginate lyase enzyme then producing Alginate oligosaccharides (AOS) as a prebiotic ingredients. The alginate lyase enzyme was produced by *Bacillus megaterium* bacteria using a discontinuous fermentor. The optimum temperature of those enzyme was 45°C while the optimum pH was 7.0. Alginate oligosaccharides production was performed with the addition of different enzyme activities (25, 50, 75, and 100 U). The result of the addition of enzymes (25, 50,75 U) showed that the polymerization degrees (DP) were between 4-5. However, the addition of enzyme (100 U) was in the range of DP 3-4. In addition, *Bifidobacteria* and *Lactobacillus* growth test showed that 1% addition of AOS media increased the growth of probiotic bacteria compared to the media without addition of AOS. The addition of enzyme with activity 50 U in AOS production was the best treatment for both probiotic bacteria.

Keywords: alginate, fermentor, probiotics

PENDAHULUAN

Prebiotik merupakan serat larut air atau bahan makanan yang tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan tetapi dapat menstimulasi pertumbuhan dan aktivitas bakteri di dalam sistem pencernaan. Mekanisme prebiotik dalam tubuh umumnya meningkatkan komposisi bakteri asam laktat (BAL) yaitu bakteri *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus*, mengurangi komposisi bakteri patogen, dan menghasilkan senyawa yang berguna untuk kesehatan. Prebiotik merupakan karbohidrat oligosakarida dengan derajat polimerisasi antara 2-10 monosakarida. Prebiotik yang dapat dimanfaatkan oleh satu jenis probiotik belum tentu dapat digunakan oleh jenis probiotik lainnya tergantung dari kemampuan mikroorganisme tersebut dalam memproduksi enzim yang diperlukan untuk metabolismenya (Manning et al. 2004). Prebiotik banyak dijumpai dari berbagai sumber makanan misalnya buah-buahan, kacang-kacangan, produk olahan susu, dan produk turunan yang berasal dari alginat misalnya *Alginate oligosaccharides* (AOS) juga dapat dijadikan sumber prebiotik.

Alginate oligosaccharides (AOS) merupakan produk hasil degradasi polisakarida alginat secara enzimatik yang mempunyai kelarutan dan bioaktivitas yang lebih baik jika dibandingkan dengan alginatnya dan mampu meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacteria*. Ramnani et al. (2012) melaporkan bahwa turunan alginat yang diproduksi dari alginat komersil (Manungel DMB) mampu meningkatkan pertumbuhan *Bifidobacteria* 9×10^{10} Logcfu/mL jika dibandingkan alginat yang belum didegradasi. Kuda et al. (2005) membandingkan laminaran, alginat yang memiliki berat molekul yang tinggi, dan alginat yang memiliki berat molekul yang rendah (turunan alginat). Hasilnya adalah alginat yang memiliki berat molekul yang tinggi tidak dapat dicerna oleh bakteri selama fermentasi dan terjadi penurunan protein terlarut 25% serta penurunan kandungan *putrefactive* yang mencegah penyakit kanker pada kolon 25-60%. Media yang ditambahkan AOS memiliki nilai aktivitas prebiotik lebih tinggi dibandingkan fructo oligosaccharides (FOS), serta terjadi peningkatan pertumbuhan

bakteri *B. bifidum* ATCC 2.952 berkisar 16-22% dalam media yang ditambahkan AOS sebanyak 1% (w/v) (Wang et al. 2006a). Qiang et al. (2009) juga melaporkan bahwa media yang ditambahkan AOS dalam perut mencit mampu mencegah pertumbuhan senyawa patogen dalam usus, misalnya *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* dan *Salmonella* sebanyak 10^4 - 10^6 Logcfu/g.

Aktivitas biologis AOS sebagai prebiotik yang dilaporkan menggunakan alginat komersil yaitu rumput laut sub tropis *Macrocystis pyrivera*, sedangkan AOS yang berasal dari rumput laut lokal misalnya *Sargasum crassifolium* belum dilaporkan. Alginat yang berasal dari rumput laut lokal memiliki kelemahan diantaranya adalah kelarutan yang rendah, tidak stabil, mudah mengalami sineresis dan mengendap pada media asam. Kelemahan tersebut menyebabkan keterbatasan penggunaannya pada produk-produk ber-pH rendah (Subaryono dan Apriani 2010).

Alginate oligosaccharides (AOS) dapat dihasilkan melalui hidrolisis polimer alginat secara kimiawi maupun enzimatik. Aida et al. (2010) menjelaskan bahwa produksi AOS secara kimia menggunakan suhu berkisar 180-240°C dan pH <5 untuk mendegradasi polimer alginat. Hasilnya menunjukkan bahwa terdapat perbedaan komposisi antara polimer alginat, yaitu manuronat dan guluronat. Manuronat lebih mudah terdegradasi dibandingkan guluronat hal ini disebabkan struktur kimia manuronat yang lebih lembut dan elastis, sedangkan struktur guluronat lebih kaku dan rapuh.

Produksi AOS dapat dilakukan secara enzimatik yaitu dengan menghidrolisis polimer alginat pada ikatan β -glikosidik sehingga membentuk monomer 4-deoksi-l-erithro-4-hexene-pirosiluronat (Falkeborg et al. 2014). Enzim yang digunakan dalam proses hidrolisis alginat adalah enzim alginat liase. Subaryono et al. (2013) melaporkan bahwa produksi enzim alginat liase dapat dilakukan dengan mengkultur bakteri *Bacillus megaterium* pada media selektif cair yang diberikan tambahan tepung alginat. Produksi AOS secara enzimatik dari bakteri *Bacillus*

megaterium menunjukkan bahwa aktivitas enzim alginat liase sangat spesifik terhadap substratnya alginat sehingga enzim alginat liase mampu mendegradasi polimer alginat baik manuronat maupun guluronat. Produksi enzim alginat liase telah banyak dilakukan dalam skala laboratorium. Peningkatan kapasitas hasil enzim alginat liase dapat dilakukan menggunakan teknologi fermentasi.

Produksi enzim dalam jumlah yang besar memberikan peluang dalam dunia industri untuk menghasilkan enzim dalam jumlah yang banyak sehingga diharapkan dapat memberikan kontribusi terhadap proses pengembangan pemanfaatan rumput laut coklat lokal menjadi produk pangan fungsional yang baik bagi kesehatan. Produksi enzim alginat liase yang dilakukan dalam penelitian ini menggunakan fermentor diskontinu yaitu inokulen dan nutrisi dicampur dalam satu tabung tertutup. Penelitian ini bertujuan untuk menghasilkan enzim alginat liase untuk memproduksi AOS sebagai bahan prebiotik.

BAHAN DAN METODE

Bahan dan Alat

Tepung alginat dari *Sargasum crassifolium*, NaCl (Merck, Darmstadt, Germany), KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Germany), Amonium Sulfat (Merck, Darmstadt, Germany), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Germany), 1-butanol (Merck, Darmstadt, Germany), asam format (Merck, Darmstadt, Germany), akuades, etanol (Merck, Darmstadt, Germany), pereaksi Bradford (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), bufer fosfat pH 7 (Bio-Rad Laboratories, Inc. US), pereaksi DNS (3,5 dinitro salicylic acid) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), CaCl 2 10 % (Merck, Darmstadt, Germany), fenol (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), Na bisulfit (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), K-Na tartarat (Merck, Darmstadt, Germany), pereduksi D-manosa (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), bovin serum albumin (Sigma-Aldrich, Missouri, USA), MRS free carbon dan empat isolat probiotik yang digunakan adalah *Bifidobacterium bifidum* BRL 130 dan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051.

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu Autoclave Hirayama HVA 110, Beaker glass, Centrifuse LMC-4200R, Erlenmeyer, Fermentor Masterflex 7518, Hot plate Cimarex, Laminar Flow Esco Optimair™ Vertical, micropipette, petri dish, spektrofotometer UV-Vis InScienpro Lab Equipment 325-1.000nm, Thin Layer Chromatography (TLC) dan pH meter Jenway 3510.

Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari dua tahap yaitu tahap pertama produksi alginat liase menggunakan fermentor dan tahap dua adalah produksi AOS.

Produksi Enzim Alginat Liase

Produksi enzim alginat liase dengan metode scale-up produksi alginat liase dikembangkan dari metode Hisano et al. (1994). Fermentor yang digunakan adalah bioreaktor diskontinu, inokulen dan nutrisi dicampur dalam satu tabung tertutup kondisi suhu, pH optimum dan tidak dipengaruhi oleh aerasi. Produksi enzim alginat liase dilakukan sebanyak 10 L, dimulai dari tahapan ekstraksi dengan mengkultur bakteri *Bacillus megaterium* pada media selektif cair yang diberikan tambahan alginat 10 g/mL, NaCl 5 g/mL, KH_2PO_4 6 g/mL, amonium sulfat 3 g/mL, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/mL selama 5 hari pada suhu 30°C, pH 7, kecepatan 250 rpm dalam fermentor. Kultur yang siap panen disentrifugasi 8.000 kali g selama 20 menit pada suhu 10°C. Supernatan dipisahkan dari endapan dan diambil sedikit untuk diuji kadar proteinnya sebelum dilakukan presipitasi. Supernatan diendapkan dengan menambahkan amonium sulfat sampai konsentrasi 35% (b/v) selama 2 jam pada suhu sekitar 5-10°C dan disentrifugasi 8.000xg selama 20 menit 10°C. Endapan diambil dan didialisis pada ukuran 10 mM dengan bufer fosfat pH 7,0 pada suhu sekitar 5-10°C selama 24 jam hingga diperoleh enzim alginat liase. Enzim alginat liase diuji kadar proteinnya menggunakan metode Bradford dan dikarakterisasi aktivitas enzim alginat liase dengan suhu optimum (30, 35, 40, 45, 50, dan 55°C), pH optimum (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11) dengan metode DNS.

Produksi *Alginate Oligosaccharides* (AOS)

Produksi AOS dilakukan dengan metode Subaryono *et al.* (2013). Enzim alginat liase dengan aktivitas 25, 50, 75, dan 100 U masing-masing dimasukkan dalam alginat rumput laut *Sargasum crassifolium* yang dilarutkan dalam air sebanyak 300 mL. Ekstrak diinkubasi di dalam shaker incubation pada suhu 45°C selama 4 jam. Ekstrak dimasukkan pada air mendidih untuk menghentikan proses inkubasi selama 10 menit. Ekstrak tersebut ditambahkan etanol 50% (v/v) kemudian disentrifugasi 8.000xg selama 20 menit pada suhu 10°C untuk diambil supernatannya. Supernatan tersebut dievaporasi pada suhu 40°C selama ±2 jam. Masing-masing AOS diujikan 1% sebagai bahan prebiotik. Bakteri probiotik yang diujikan meliputi *Bifidobacterium longum* dan *Lactobacillus acidophilus*.

Analisis Kadar Protein dengan Bradford (Bradford 1976)

Analisis kadar protein dengan Bradford dilakukan dengan prinsip Bradford (1976). Persiapan preaksi Bradford dilakukan dengan cara melarutkan 5 mg coomassive brilliant blue G-250 dalam 2,5 mL etanol 95% (v/v), lalu ditambahkan dengan 5 mL asam fosfat 85% (v/v). Larutan diaduk hingga homogen dan ditambahkan akuades hingga 250 mL kemudian disaring dengan kertas saring Whatman no. 1 dan diencerkan 5 kali sesaat sebelum digunakan. Sebanyak 0,1 mL sampel ditambahkan 3 mL pereaksi Bradford dalam tabung reaksi diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit dan diukur dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 595 nm. Larutan standar protein pada konsentrasi 0,5-2 ppm menggunakan standar BSA. Tahap berikutnya membuat kurva standar dengan absorbansi sebagai ordinat (Y) dan konsentrasi protein sebagai absis (X). Berdasarkan kurva tersebut dapat ditentukan konsentrasi protein dalam sampel. Plot hubungan antara absorbansi sampel dengan kurva standar dan kadar protein dihitung dalam mg/mL.

Analisis Produk Prebiotik AOS berdasarkan Derajat Polimerisasi (DP)

Analisis derajat polimerisasi dilakukan dengan metode Subaryono *et al.* (2016). Produk AOS yang diperoleh, dikonfirmasi DP nya menggunakan TLC dengan matriks Silika G60. Matriks Silika G60 yang telah diberi tanda AOS dan FOS sebagai kontrol dimasukkan dalam tabung yang berisi larutan dengan konsentrasi 1-butanol : asam format : air (4:6:1).

Analisis Pertumbuhan BAL dengan Metode Spektrofotometri

Analisis pertumbuhan BAL dengan metode spektrofotometri mengacu pada Wang *et al.* (2006a) yang dimodifikasi. Uji fermentasi AOS dilakukan dengan memodifikasi media pertumbuhan BAL. Media yang digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri adalah media MRS tetapi glukosa media diganti dengan AOS. Bahan-bahan yang digunakan yaitu pepton 10 g/L, ekstrak daging 8g/L, ekstrak khamir 4 g/L, dipotasium hidrogen fosfat 2 g/L, sodium asetat 5 g/L, amonium klorida 2 g/L, magnesium sulfat 0,2 g/L, mangan sulfat 0,05 g/L, agar 5,4 g/L, kalsium bikarbonat 3,6 g/L, akuades 1 L. Bakteri asam laktat ditumbuhkan pada media dan waktu pengamatan dilakukan dimulai dari jam ke- 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 hingga 21 jam dan diulang sebanyak tiga kali. Kontrol yang digunakan adalah media tanpa penambahan AOS.

Analisis Pertumbuhan BAL dengan Metode Hitungan Cawan

Analisis pertumbuhan BAL dengan metode hitungan cawan menurut Kaplan dan Hunkins (2000). Jumlah sel bakteri uji dihitung pada masing-masing lama inkubasi (0, 3, 6, 9, 12, 18, dan 21 jam). Sampel hasil fermentasi AOS diambil sebanyak 1 mL dimasukkan dalam tabung reaksi dan dilakukan pengenceran sampai 10-10 dengan larutan NaCl 0,98%. Larutan pengenceran diambil 1 mL, diinokulasi pada MRS agar dengan metode hitung cawan yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 21 jam. Kontrol tidak

ditambahkan AOS. Jumlah koloni yang dicatat dan dihitung dengan rumusan sebagai berikut:

$$N = \Sigma C / [(1 * n1) + (0,1 * n2)] * (d)$$

Keterangan:

- N: Jumlah koloni (CFU) per mL atau gram produk
 ΣC: Total seluruh koloni pada cawan yang dapat dihitung
 n1: Jumlah cawan dari pengenceran pertama yang dihitung
 n2: Jumlah cawan dari pengenceran kedua yang dihitung
 d: Nilai pengenceran dari penghitungan pertama yang digunakan

Analisis pH

Nilai derajat keasaman (pH) diukur menggunakan pH meter (AOAC 1998) pada setiap perlakuan setelah inkubasi 0, 3, 6, 9, 12, 18, dan 21 jam.

Analisis Data

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan digunakan untuk menentukan suhu optimum dan pH optimum enzim alginat liase. Pengolahan data dilakukan dengan *analysis of variance* (ANOVA) dengan analisis lanjutan menggunakan uji Duncan pada taraf signifikansi 5%.

Uji *Independent T-test* digunakan untuk membedakan analisis kadar protein. Rancangan acak lengkap faktorial digunakan untuk melihat pengaruh penambahan enzim alginat liase terhadap AOS sebagai bahan prebiotik. Rancangan acak lengkap faktorial dilakukan dengan dua faktor. Faktor pertama adalah AOS yang diproduksi menggunakan aktivitas enzim 25, 50, 75, dan 100 U. Faktor kedua adalah jenis bakteri BAL yaitu *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 dan *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051.

Pengolahan data hasil analisis penelitian dilakukan dengan software Microsoft Excel dan *Statistical Productand Service Solution* (SPSS) version 16,0.

HASIL DAN PEMBAHASAN

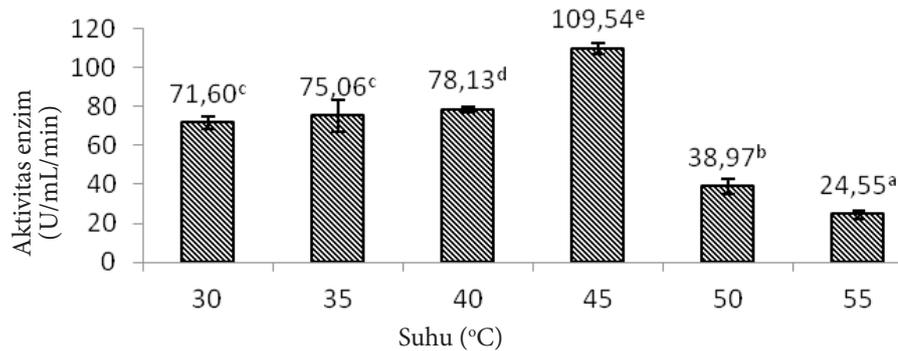
Kadar Protein Enzim Alginat Liase

Kandungan protein di dalam enzim sangat mempengaruhi kemampuan katalitik suatu enzim. Peningkatan kadar protein dalam suatu enzim alginat liase menyebabkan daya katalitiknya akan meningkat (Terakado *et al.* 2012). Peningkatan kadar protein pada penelitian ini terjadi setelah proses presipitasi dengan amonium sulfat yaitu dari 1,49 menjadi 4,15 mg/L. Hasil uji statistik *Independent T-test* data menunjukkan bahwa kadar protein sebelum presipitasi berbeda nyata setelah presipitasi ($p < 0,05$). Proses presipitasi dapat mempengaruhi karena garam yang mampu memisahkan protein, penambahan garam pada konsentrasi tinggi akan menurunkan kelarutan protein. Salah satu garam yang digunakan dalam proses presipitasi yaitu amonium sulfat $(NH_4)_2SO_4$ dan dilanjutkan menggunakan kantong dialisis sehingga meningkatkan konsentrasi total protein enzim alginat liase. Peningkatan kadar protein enzim alginat liase setelah presipitasi dilaporkan oleh beberapa penelitian yaitu Subaryono *et al.* (2016); Yamamoto *et al.* (2008); Rahman *et al.* (2010).

Suhu Enzim Alginat Liase

Enzim memiliki aktivitas maksimum pada suhu tertentu, aktivitas enzim akan semakin meningkat dengan bertambahnya suhu hingga suhu optimum tercapai (Shen *et al.* 2006). Suhu optimum alginat liase dapat dilihat pada Gambar 1.

Hasil uji statistik menggunakan *One way ANOVA* yang dilanjutkan dengan uji Duncan menunjukkan bahwa suhu 45°C berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim ($p < 0,05$). Aktivitas optimum enzim alginat liase yang dihasilkan dari fermentor pada suhu 45°C yaitu 109,54 U/mL/min dan minimum pada suhu 55°C yaitu 24,55 unit/mL/min (Gambar 1). Subaryono *et al.* (2016) melaporkan bahwa suhu optimum enzim alginat liase yang dihasilkan dari isolat *Bacillus megaterium* dalam skala laboratorium memiliki aktivitas optimum pada suhu 45°C.



Gambar 1 Aktivitas alginat liase pada berbagai suhu. Angka dengan huruf berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) menggunakan uji Duncan taraf 5 %

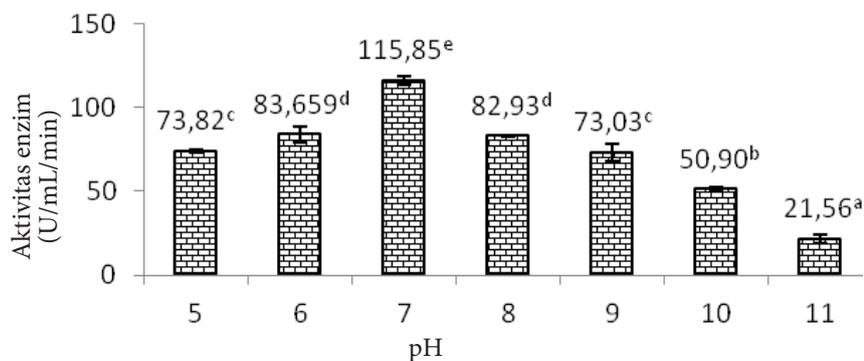
Enzim alginat liase merupakan enzim yang tidak tahan panas (*heat unstable*) karena memiliki aktivitas enzim yang rendah pada suhu di atas 65°C.

Suhu optimum enzim alginat liase berbeda-beda. Wong *et al.* (2000) menjelaskan bahwa perbedaan suhu dan pH pada enzim alginat liase karena tempat tumbuh rumput laut, umur panen, jenis rumput laut dan jenis bakteri yang menghasilkannya. Enzim alginat liase yang dihasilkan dari mengkultur isolat *Bacillus* sp. ATB-1015 pada media yang diberi tambahan alginat dari rumput laut *P. auruginosa* menghasilkan enzim alginat liase yang memiliki suhu optimum 37°C, namun rumput laut yang sama dari isolat *Bacillus circulans* JBH2 menghasilkan enzim alginat liase memiliki suhu optimum 50°C. Zhu *et al.* (2015) menjelaskan bahwa produksi enzim alginat liase yang dihasilkan dari isolat *Vibrio* sp. W13 yang diberi media alginat komersial *Macrocytis pyrivera* menghasilkan enzim alginat liase yang memiliki suhu optimum 30°C.

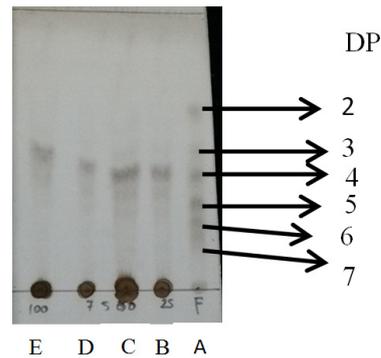
Nilai pH Enzim Alginat Liase

Semua reaksi enzim dipengaruhi oleh pH. Enzim adalah protein yang tersusun atas asam amino yang dapat mengadakan ionisasi (mengikat) dan melepaskan proton atau ion hidrogen pada gugus amino, karboksil dan gugus fungsional lainnya sehingga perubahan nilai pH akan mengakibatkan enzim mengalami denaturasi dengan adanya gangguan terhadap berbagai interaksi non kovalen yang menjaga kestabilan struktur 3 dimensi enzim (Gupta dan Ghannam 2011). Optimasi nilai pH enzim alginat liase dapat dilihat pada Gambar 2.

Hasil uji statistik *One way* ANOVA enzim alginat liase menunjukkan bahwa pH berpengaruh signifikan terhadap aktivitas enzim ($p < 0,05$). Enzim alginat liase memiliki aktivitas tertinggi pada pH 7 yang merupakan pH optimum yaitu 115,85 unit/mL/menit. Subaryono *et al.* (2016) menyatakan bahwa nilai pH optimum enzim alginat liase yang dihasilkan dari isolat *Bacillus megaterium* memiliki aktivitas optimum pada pH 7.



Gambar 2 Aktivitas enzim alginat pada berbagai pH. Angka dengan huruf berbeda menunjukkan perbedaan nyata ($p < 0,05$) menggunakan uji Duncan antar enzim alginat liase pada tiap aktivitas pH



Gambar 3 Zymogram TLC alginate oligosaccharides (AOS) dari berbagai aktivitas enzim, (A) Kontrol FOS; (B) 25; (C) 50; (D): 75; E: 100

Elahwany dan Elborai (2012) menyatakan bahwa enzim alginat liase bersifat sangat spesifik terhadap nilai pH. Wang *et al.* (2006b) melaporkan bahwa nilai pH optimum enzim alginat liase berbeda-beda tergantung dari jenis bakteri dan jenis rumput laut yang digunakan. Enzim alginat liase yang berasal dari rumput laut *P. aeruginosa* kemudian diisolasi dari bakteri *Vibrio* sp. memiliki pH optimumnya 7,5 dan pada rumput laut yang sama isolat bakteri *B. circulans* JBH2 memiliki pH 5,8 (Wong *et al.* 2000). Zhu *et al.* (2015) juga menjelaskan bahwa alginat liase yang dihasilkan dari isolat *Vibrio* sp. W13 dengan tambahan alginat alginat komersil *Macrocytis pyrivera* dalam media menghasilkan enzim alginat liase yang memiliki pH optimum 8,0.

Derajat Polimerisasi

Karakteristik alginat lokal lebih kaya guluronat sedangkan alginat komersil yang lebih kaya dengan manuronat. Li *et al.* (2016) melaporkan bahwa alginat yang kaya manuronat lebih mudah didegradasi jika dibandingkan dengan alginat yang kaya guluronat. Keberhasilan dalam memproduksi turunan alginat rantai pendek dapat dilihat dari ukuran derajat polimerisasi (DP). Derajat polimerisasi adalah uji yang digunakan untuk menentukan polimer alginat selama proses degradasi enzim. Polimer alginat yang panjang menyebabkan tidak mudah dicerna oleh bakteri *Bifidobacteria* dan *Lactobacilus*. Proses degradasi polimer alginat berdasarkan penelitian Falkeborg *et al.* (2014) adalah terbentuknya ikatan dimer, trimer, dan tetramer dari senyawa 4-deoxy-l-erythro-4-hexene-pyranosyluronate, semakin kecil

ukuran polimer maka semakin meningkat retensi dalam uji TLC. Zymogram TLC menunjukkan posisi spot polimer AOS dapat dilihat pada Gambar 3.

Hasil zymogram TLC menunjukkan bahwa pada penambahan aktivitas enzim alginat liase sebanyak 25, 50, dan 75 U menunjukkan retensi pada DP 4-5 sedangkan penambahan enzim 100 U menunjukkan DP 3-4. Hasil zymogram TLC juga menunjukkan bahwa semakin tinggi aktivitas enzim alginat liase yang ditambahkan dalam produksi AOS maka semakin tinggi retensi yang dihasilkan dan semakin kecil nilai DP.

Proses depolimerisasi AOS dari alginat liase dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya adalah suhu, waktu, pH, dan jenis bakteri penghasil alginat liase. Waktu dan suhu dapat mempengaruhi nilai DP berdasarkan penelitian Pawar dan Edgar (2012) melaporkan dalam penelitiannya bahwa semakin lama waktu inkubasi maka DP yang dihasilkan semakin rendah, yaitu DP 9 selama 2 jam dan suhu inkubasi yang digunakan adalah suhu optimum enzim alginat liase yaitu 40°C. Iwamoto *et al.* (2005) memproduksi AOS dari alginat komersil secara enzimatik dengan alginat liase dari *Pseudoalteromonas* sp. memperoleh DP sekitar 1-9. Zhu *et al.* (2015) menjelaskan bahwa AOS dari alginat komersil yang berhasil dibuat dari bakteri *Vibrio* sp. W13 menghasilkan DP 2-5.

Subaryono *et al.* (2010) menjelaskan bahwa keberhasilan produksi AOS dapat dilihat dari nilai DP yang menunjukkan adanya perubahan polimer menjadi monomer. Subaryono *et al.* (2010) menjelaskan bahwa alginat sebelum didegradasi mempunyai

DP yang cukup tinggi yaitu DP 180–930. Produksi AOS dengan penambahan enzim dari berbagai konsentrasi enzim dalam penelitian ini berhasil diproduksi, hal ini dibuktikan dengan nilai DP tidak lebih dari 10 monosakarida. Haryati (2011) menjelaskan dalam penelitiannya bahwa oligosakarida mengandung DP antara 2–10 monosakarida. Oligosakarida mempunyai struktur kimia yang berbeda, misalnya Inulin memiliki DP sekitar 2–60 dan FOS memiliki DP sekitar 2–4.

Pengaruh Aktivitas Alginat Liase pada Substrat AOS terhadap Jumlah Koloni Bakteri *Bifidobacterium longum* ATCC 15707

Nuraida *et al.* (2011) men bahwa *Bifidobacterium longum* merupakan salah satu bakteri probiotik yang banyak terdapat pada kolon manusia dan dapat memberikan efek kesehatan dalam tubuh manusia. *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 merupakan bakteri anaerob dan gram positif. Gagnon *et al.* (2015) menjelaskan bahwa pertumbuhan *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 dalam kolon dapat berkembang baik dengan nutrisi yang berasal dari oligosakarida dan bertahan hidup hingga 48 jam. Alginat oligosaccharides (AOS) bisa dikatakan sebagai prebiotik, hal ini ditunjukkan dengan adanya peningkatan jumlah bakteri probiotik selama

waktu fermentasi. Pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 selama waktu fermentasi prebiotik AOS dapat dilihat pada Tabel 1.

Media yang ditambahkan perlakuan AOS mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 dibandingkan dengan media yang tidak ditambahkan AOS. Penambahan aktivitas enzim sebanyak 50 U dalam produksi AOS pada waktu fermentasi jam ke-18 menunjukkan jumlah bakteri yang paling tinggi yaitu 11,01 Logcfu/mL. Media kontrol tanpa penambahan AOS jumlah bakteri tertinggi pada waktu ke-15 yaitu 5,68 Logcfu/mL. Hasil analisis statistik Two way ANOVA menunjukkan bahwa adanya pengaruh waktu fermentasi terhadap jumlah bakteri ($p < 0,05$). Waktu ke-18 berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan waktu yang lainnya, karena merupakan waktu yang mempunyai nilai OD (*optical density*) tertinggi. Nilai OD menunjukkan pertumbuhan bakteri dengan semakin tinggi nilai OD maka semakin banyak bakteri yang tumbuh. Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa adanya pengaruh penambahan enzim dalam produksi AOS berbeda nyata terhadap jumlah bakteri ($p < 0,05$). Penambahan enzim dengan aktivitas 50 U dalam produksi AOS berbeda nyata dengan perlakuan lainnya. Penambahan enzim dengan aktivitas 50 U dalam produksi AOS dapat menjadi nutrisi

Tabel 1 Pertumbuhan bakteri *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 (Log cfu/mL) selama waktu fermentasi prebiotik AOS

Waktu Fermentasi (Jam)	Penambahan enzim alginat liase				
	Kontrol	25 U	50 U	75 U	100 U
0	4,14±0,13 ^{aG}	4,38±0,85 ^{bG}	5,14±0,49 ^{eG}	5,14±0,47 ^{dG}	4,37±0,38 ^{cG}
3	4,47±0,25 ^{aH}	5,09±0,83 ^{bH}	5,91±0,40 ^{eH}	5,61±0,84 ^{dH}	5,43±0,24 ^{cH}
6	5,04±0,27 ^{aI}	5,41±0,56 ^{bI}	7,01±0,27 ^{eI}	6,47±0,50 ^{dI}	6,26±0,13 ^{cI}
9	5,41±0,27 ^{aJ}	5,77±0,07 ^{bJ}	8,82±0,47 ^{eJ}	7,99±0,90 ^{dJ}	6,78±0,22 ^{cJ}
12	5,62±0,33 ^{aK}	5,95±0,47 ^{bK}	9,86±0,35 ^{eK}	8,89±1,57 ^{dK}	7,68±0,51 ^{cK}
15	5,68±0,35 ^{aL}	6,53±0,54 ^{bL}	10,59±0,82 ^{eL}	9,76±0,60 ^{dL}	8,58±0,79 ^{cL}
18	4,57±0,28 ^{aM}	6,69±0,33 ^{bM}	11,01±1,57 ^{eM}	9,86±0,69 ^{dM}	8,79±1,69 ^{cM}
21	1,82±0,53 ^{aF}	0,15±0,15 ^{bF}	6,54±2,12 ^{eF}	5,83±0,42 ^{dF}	5,43±0,39 ^{cF}

Keterangan: Huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan AOS terhadap jumlah bakteri. Huruf besar yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan waktu fermentasi terhadap jumlah bakteri (uji jarak berganda Duncan; $p < 0,05$). Nilai yang tertera merupakan nilai rata-rata dan simpangan baku

yang tepat bagi pertumbuhan *Bifidobacterium longum* ATCC 15707. Subaryono et al. (2016) dalam penelitiannya menjelaskan bahwa AOS dengan konsentrasi enzim yang sedikit menyebabkan sedikit polimer yang terdegradasi sehingga jumlahnya belum optimal untuk pertumbuhan bakteri. Produksi AOS dengan konsentrasi enzim yang terlalu banyak menyebabkan kejenuhan di permukaan sel bakteri sehingga menghambat pertumbuhan bakteri. Jalili et al. (2010) menjelaskan bahwa *Bifidobacterium longum* bersifat sangat spesifik terhadap substratnya dan pada kondisi optimum *Bifidobacterium longum* mampu mengubah nutrisi menjadi vitamin dan senyawa asam laktat.

Ramnani et al. (2012) menguji beberapa jenis alginat dari rumput laut dengan berat molekul yang rendah setelah didegradasi, kemudian diuji pertumbuhan bakteri pada genus *Bifidobacterium* hasilnya menunjukkan bahwa media yang ditambahkan alginat yang telah didegradasi mengalami peningkatan jumlah bakteri setelah 24 jam selama fermentasi misalnya pada rumput laut *Gelidium seaweed* 8,19 log cells/mL, tepung alginat (*Gelidium-derived*) 8,06 log cells/mL, *Gracilaria seaweed* 8,41 log cells/mL, tepung alginat (*Gracilaria-derived*) 8,09 log cells/mL, rumput laut *Assophyllum nodosum* 7,94 log cells/mL. *Nodosum seaweed* 8,13 log cells/mL,

tepung alginat komersil Manugel DMB 8,21 log cells/mL. Pertumbuhan *Bifidobacterium longum* yang ditambahkan AOS berdasarkan penelitian Wang et al. (2006a) jumlah bakteri lebih tinggi 22% dari pertumbuhan media yang ditambahkan FOS selama 24 jam.

Pengaruh Aktivitas Alginat Liase pada Substrat AOS terhadap Jumlah Koloni Bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051

Manin (2010) menjelaskan bahwa *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 merupakan bakteri Lactobacilli homofermentatif obligat, berbentuk batang (ujung membulat) dengan ukuran 0,6-0,9 x 1,5-6 µm, dan bentuk tunggal, berpasangan atau rantai pendek. Pertami et al. (2013) melaporkan bahwa *Lactobacillus acidophilus* menghasilkan riboflavin, asam pantotenat, asam folat dan niasin untuk tumbuh selama fermentasi, *Lactobacillus acidophilus* tidak tumbuh pada suhu <5°C, tumbuh dengan baik pada suhu 35-45°C dan pH optimal pertumbuhan adalah 5,5-6,0. Pengaruh konsentrasi AOS selama waktu fermentasi dapat dilihat dari Tabel 2.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu fermentasi berpengaruh terhadap jumlah bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051. Waktu fermentasi jam

Tabel 2 Pertumbuhan bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 (Log cfu/mL) selama waktu fermentasi prebiotik AOS

Waktu Fermentasi (Jam)	Penambahan enzim alginat liase				
	Kontrol	25 U	50 U	75 U	100 U
0	4,30±0,08 ^{aF}	4,69±0,38 ^{bF}	4,67±0,37 ^{eF}	4,62±0,38 ^{dF}	4,65±0,41 ^{cF}
3	4,66±0,05 ^{aG}	5,29±1,43 ^{bG}	4,74±0,43 ^{eG}	4,86±0,36 ^{dG}	4,94±0,38 ^{cG}
6	4,88±0,23 ^{aG}	5,71±0,35 ^{bG}	5,06±0,35 ^{eG}	5,35±0,32 ^{dG}	5,25±0,48 ^{cG}
9	5,09±0,20 ^{aH}	5,91±0,41 ^{bH}	6,14±0,31 ^{eH}	6,09±0,33 ^{dH}	6,55±0,55 ^{cH}
12	5,29±0,09 ^{aI}	6,29±0,54 ^{bI}	7,34±0,44 ^{eI}	7,60±0,41 ^{dI}	6,86±0,59 ^{cI}
15	5,43±0,02 ^{aJ}	7,21±1,79 ^{bJ}	9,47±0,34 ^{eJ}	8,43±0,35 ^{dJ}	7,37±0,36 ^{cJ}
18	4,97±0,31 ^{aJ}	8,01±0,36 ^{bJ}	10,59±0,39 ^{eJ}	9,48±0,34 ^{dJ}	7,73±0,44 ^{cJ}
21	1,60±0,26 ^{aJ}	4,65±0,38 ^{bH}	4,26±0,35 ^{eH}	4,30±0,35 ^{dH}	1,59±0,34 ^{cH}

Keterangan: Huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan AOS terhadap jumlah bakteri. Huruf besar yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan waktu fermentasi terhadap jumlah bakteri (uji jarak berganda Duncan; p<0,05). Nilai yang tertera merupakan nilai rata-rata dan simpangan baku

Tabel 3 Nilai pH *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 selama waktu fermentasi prebiotik AOS

Waktu Fermentasi (Jam)	Perlakuan				
	Kontrol	25 U	50 U	75 U	100 U
0	8,35±0,30 ^{aK}	7,71±0,29 ^{aK}	7,5±0,94 ^{aK}	7,80±0,62 ^{aK}	8,17±0,81 ^{aK}
3	7,85±0,45 ^{aJ}	7,28±0,59 ^{aJ}	6,48±0,91 ^{aJ}	6,93±0,41 ^{aJ}	7,65±0,47 ^{aJ}
6	7,23±0,29 ^{aI}	6,68±0,32 ^{aI}	5,89±0,47 ^{aI}	6,22±0,46 ^{aI}	6,93±0,41 ^{aI}
9	6,81±0,40 ^{aI}	5,98±0,43 ^{aI}	5,24±0,30 ^{aI}	5,56±0,69 ^{aI}	6,46±0,27 ^{aI}
12	6,12±0,51 ^{aH}	5,53±0,56 ^{aH}	4,77±0,64 ^{aH}	5,13±0,78 ^{aH}	5,81±0,72 ^{aH}
15	5,61±0,70 ^{aG}	4,72±0,56 ^{aG}	4,12±0,49 ^{aG}	4,37±0,82 ^{aG}	5,20±0,48 ^{aG}
18	4,57±0,66 ^{aF}	3,87±0,46 ^{aF}	3,37±0,09 ^{aF}	3,67±0,41 ^{aF}	4,17±0,74 ^{aF}
21	3,54±0,33 ^{aE}	2,89±0,61 ^{aE}	2,30±0,93 ^{aE}	2,64±0,83 ^{aE}	3,15±0,60 ^{aE}

Keterangan: Huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan AOS terhadap jumlah bakteri. Huruf besar yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan waktu fermentasi terhadap jumlah bakteri (uji jarak berganda Duncan; $p < 0,05$). Nilai yang tertera merupakan nilai rata-rata dan simpangan baku

ke- 15 tidak berbeda nyata dengan jam ke- 18 namun berbeda nyata ($p < 0,05$) dengan waktu dengan yang lainnya. Jam ke-15 dan jam ke-18 merupakan waktu yang mempunyai nilai OD yang hampir sama, hal ini menunjukkan bahwa pertumbuhan bakteri pada kedua jam tersebut dalam keadaan statis. Keadaan statis merupakan keadaan antara nutrisi dan bakteri dalam keadaan seimbangan.

Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa penambahan aktivitas enzim dalam produksi AOS berpengaruh terhadap jumlah bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051. Penambahan enzim dengan aktivitas 50 U dalam produksi AOS berbeda nyata dengan penambahan enzim lainnya. Pengaruh penambahan aktivitas enzim dalam produksi AOS yang berbeda-beda menyebabkan terbentuknya AOS dengan struktur kimia yang berbeda. Perbedaan disebabkan komposisi polimer alginat, alginat komersial memiliki lebih banyak manuronat sehingga baik sebagai penstabil, sedangkan alginat lokal lebih banyak mengandung guluronat yang sangat mudah mengalami sineresis. Li *et al.* (2016) menyatakan bahwa senyawa guluronat lebih sulit mengalami degradasi dibanding dengan senyawa manuronat hal ini karena struktur kimia dari guluronat kaku dan rapuh.

Alginat oligosaccharides yang diproduksi dengan penambahan enzim liase dengan aktivitas 50 U memiliki jumlah bakteri

paling banyak, hal ini menunjukkan bahwa penambahan enzim dengan aktivitas 50 U dalam produksi AOS merupakan penambahan yang tepat sehingga diperoleh AOS dengan struktur kimia yang cocok untuk dapat dimetabolisme oleh bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051. Hardiningsih *et al.* (2006) menyatakan bahwa bakteri *Lactobacillus* dalam bentuk probiotik jika mendapat nutrisi yang cocok selama masa pertumbuhan dapat digunakan untuk mendukung peningkatan kesehatan. Bakteri tersebut dapat berperan menjaga keseimbangan asam dan basa sehingga pH dalam kolon konstan. *Lactobacillus acidophilus* dapat aktif pada pH rendah dan menghasilkan asam laktat. Pertumbuhan *Lactobacillus acidophilus* dalam usus tikus selama dua minggu berdasarkan penelitian Wang *et al.* (2006a) terjadi peningkatan jumlah bakteri 8,54 log CFU/g dibandingkan dengan kontrol 7,85 log CFU/g.

Pengaruh Aktivitas Alginat Liase pada Substrat AOS terhadap pH Koloni Bakteri Probiotiks *Bifidobacterium longum* ATCC 15707

Perubahan nilai pH selama waktu fermentasi dibuktikan dengan analisis statistik yang menunjukkan bahwa waktu fermentasi dapat mempengaruhi nilai pH. Perubahan nilai pH selama waktu fermentasi dapat dilihat pada Tabel 3.

Nilai pH media mengalami penurunan selama waktu fermentasi. Penambahan enzim dengan aktivitas 50 U dalam produksi AOS menunjukkan penurunan nilai pH yang paling rendah. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa adanya pengaruh waktu fermentasi terhadap nilai pH media. Waktu fermentasi jam ke-0 berbeda nyata dengan waktu yang lainnya ($p < 0,05$). Waktu ke-0 merupakan waktu dengan nilai pH tertinggi berkisar antara 7-8, artinya pH media jam ke-0 bersifat netral. Waktu fermentasi ke-21 merupakan nilai pH terendah. Nilai pH yang rendah disebabkan karena terbentuknya asam selama fermentasi. Hasil analisis statistik juga menjelaskan bahwa penambahan enzim dengan aktivitas 25 U tidak berbeda nyata dengan kontrol, penambahan enzim dengan aktivitas 50 U tidak berbeda nyata dengan penambahan enzim dengan aktivitas 100 U, dan penambahan enzim dengan aktivitas 75 U dalam produksi AOS berbeda nyata dengan penambahan aktivitas enzim 25, 50, dan 100 U. Penambahan aktivitas enzim sebanyak 50 U merupakan penurunan nilai pH media yang paling rendah. Wang et al. (2006a) melaporkan bahwa penurunan pH merupakan indikator pertumbuhan bakteri karena perubahan pH menandakan AOS dapat dimanfaatkan oleh bakteri *Bifidobacterium longum* ATCC 1570 dan terbentuknya asam lemak rantai pendek.

Pengaruh Aktivitas Alginat Liase pada Substrat AOS terhadap pH Koloni Bakteri Probiotik *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051

Lactobacillus acidophilus FNCC 0051 memiliki pH optimal selama masa pertumbuhannya yaitu sekitar 5,5-6,0 (Pertami et al. 2013). Bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 dalam penelitian ini juga mengalami penurunan nilai pH selama waktu fermentasi. Perubahan nilai pH selama waktu fermentasi dapat dilihat pada Tabel 4.

Hasil analisis statistik menunjukkan bahwa waktu fermentasi berpengaruh terhadap nilai pH media ($p < 0,05$). Waktu fermentasi jam ke-0 tidak berbeda nyata dengan waktu fermentasi jam ke 3 tetapi nilai pH media berbeda nyata dengan yang lainnya. Waktu fermentasi ke-0 memiliki nilai pH yang paling tinggi, dan waktu fermentasi jam ke-21 menunjukkan nilai pH yang paling rendah, hal ini menunjukkan bahwa semakin lama waktu fermentasi maka nilai pH media semakin menurun. Penurunan nilai pH pada media menandakan bahwa bakteri *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 mampu memetabolisme AOS sehingga menghasilkan asam lemak rantai pendek.

Hasil analisis statistik juga menunjukkan bahwa adanya pengaruh penambahan aktivitas enzim terhadap nilai pH media

Tabel 4 Nilai pH *Lactobacillus acidophilus* FNCC 0051 selama waktu fermentasi prebiotik AOS

Waktu Fermentasi (Jam)	Perlakuan				
	Kontrol	25 U	50 U	75 U	100 U
0	8,28±0,46 ^{aI}	8,25±0,36 ^{aI}	7,80±0,44 ^{aI}	7,92±0,56 ^{aI}	8,04±0,57 ^{aI}
3	7,90±0,31 ^{aI}	7,64±0,42 ^{aI}	7,00±0,33 ^{aI}	7,24±0,03 ^{aI}	7,47±0,20 ^{aI}
6	7,61±0,27 ^{aH}	7,28±0,70 ^{aH}	6,03±0,24 ^{aH}	6,49±0,29 ^{aH}	6,75±0,60 ^{aH}
9	6,95±0,57 ^{aG}	6,62±0,58 ^{aG}	5,19±0,25 ^{aG}	5,89±0,96 ^{aG}	6,30±0,19 ^{aG}
12	6,38±0,49 ^{aF}	6,09±0,50 ^{aF}	4,64±0,78 ^{aF}	5,25±0,82 ^{aF}	5,73±0,18 ^{aF}
15	5,65±0,47 ^{aG}	5,21±0,04 ^{aG}	4,00±0,22 ^{aG}	4,60±0,86 ^{aG}	4,92±0,53 ^{aG}
18	4,75±0,46 ^{aG}	4,44±0,28 ^{aG}	3,36±0,05 ^{aG}	3,85±0,53 ^{aG}	4,19±0,39 ^{aG}
21	4,10±0,44 ^{aE}	3,80±0,58 ^{aE}	2,79±0,14 ^{aE}	3,09±0,12 ^{aE}	3,47±0,69 ^{aE}

Keterangan: Huruf kecil yang berbeda pada baris yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan AOS terhadap jumlah bakteri. Huruf besar yang berbeda pada kolom yang sama menunjukkan berbeda nyata antara pengaruh perlakuan waktu fermentasi terhadap jumlah bakteri (uji jarak berganda Duncan; $p < 0,05$). Nilai yang tertera merupakan nilai rata-rata dan simpangan baku

($p < 0,05$). Media kontrol menunjukkan nilai pH yang paling tinggi dan perlakuan AOS dengan penambahan enzim dengan aktivitas 50 U memiliki nilai pH yang paling rendah. *Lactobacillus acidophilus* merupakan bakteri penghasil asam laktat yang ditandai dengan menurunnya nilai pH. Hardiningsih et al. (2006) menjelaskan bahwa *Lactobacillus acidophilus* menunjukkan peningkatan jumlah bakteri selama waktu fermentasi yaitu 12% dan *Lactobacillus acidophilus* mampu bertahan hidup pada pH rendah <5.

Ramnani et al. (2012) dalam penelitiannya membandingkan rumput laut dan alginat yang telah mengalami depolimerisasi sebagai bahan prebiotik hasilnya adalah alginat yang difermentasi selama 24 jam dapat meningkatkan jumlah asam lemak rantai pendek yaitu asetat 88% dan propionat 12 %.

KESIMPULAN

Enzim alginat liase berhasil diisolasi dari bakteri *Bacillus megaterium* dengan menggunakan fermentor diskontinu. Aktivitas optimum enzim alginat liase yaitu pada pH 7,0 dan suhu 45°C. Kadar Protein enzim alginat liase setelah dilakukan presipitasi 4,08 mg/L. Produksi AOS berhasil diproduksi menggunakan enzim alginat liase. Penambahan aktivitas enzim dalam produksi AOS dapat mendegradasi polimer, penambahan enzim dengan aktivitas 25, 50 dan 75 U menghasilkan DP 4-5, sedangkan penambahan aktivitas enzim sebanyak 100 U menghasilkan DP 3-4. Pertumbuhan bakteri probiotik *Bifidobacteria* dan *Lactobacillus* menunjukkan bahwa media yang ditambahkan perlakuan AOS mampu meningkatkan pertumbuhan bakteri probiotik. Aktivitas enzim yang ditambahkan sebanyak 50 U dalam produksi AOS merupakan perlakuan terbaik dari kedua bakteri probiotik.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Pusat Penelitian dan Pengembangan Daya Saing Produk dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan (P4DSPBKP) untuk bantuan produk dan biaya penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [AOAC] Association of Official Analytical Chemist. 1998. Official Method of Analysis of The Association of Official Analytical of Chemist. Virginia (US): Association of Official Analytical Chemist.
- Aida TM, Yamagata T, Watanabe M, Smith Jr LA. 2010. Depolymerization of sodium alginate under hydrothermal conditions. *Carbohydrate Polymers*. 80(1): 296–302.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quatification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 234-254.
- Elahwany AMD dan Elborai AM. 2012. Optimization of medium composition for extra cellular alginate lyase of a marine bacterium. *Journal of African Microbiology Research*. 6(10): 2403-2409.
- Falkeborg M, Cheong LZ, Gianfco C, Sztukiel KM, Kristensen K, Glasius M, Xu X, Guo Z. 2014. Alginate Oligosakarides: Enzymatic Preparation and Antioxidant Property Evaluation. *Journal of Food Chemistry*. 164:185-194.
- Gagnon M, Patricia S, Audrey R, Gisèle LP, Denis R. 2015. Bioaccessible Antioxidants in Milk Fermented by *Bifidobacterium longum* subsp. longum Strains. Biomed Research International. Artickel ID 169381 (<http://dx.doi.org/10.1155/2015/169381>).
- Gupta S dan Ghannam AN. 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Sci and Technol*. 22(1):315-326.
- Hardiningsih R, Rostiati Nrn, Titin Y. 2006. Isolasi dan uji resistensi beberapa isolat *Lactobacillus* pada pH rendah. *Biodiversitas*. 7(1): 15-17.
- Haryati T. 2011. Probiotik dan prebiotik sebagai pakan imbuhan nonruminansia. *Wartazoa*. 21(3): 25-132.
- Hisano T, Nishimura M, Yamashita T, Sakaguchi K, Takagi M, Imanaka T, Akira, Murata K. 1994. Production of bacterial alginate-specific lyase by recombinant *Bacillus subtilis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 78(1):79-83.

- Iwamoto M, Kurachi M, Nakashima T, Kim D, Yamaguchi K, Oda T, Iwamoto Y, Muramatsu T. 2005. Structure-activity relationship of Alginate oligosaccharides in the induction of cytokine production from RAW2647 cells. *FEBS Letters*. 79(20): 4423-4429.
- Jalili H, Hadi R, dan Saidi M. 2010. Kinetic analysis and effect of culture medium and coating materials during free and immobilized cell cultures of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis Bb 12. *Journal of Biotechnology*. 13(2):1-10.
- Kaplan H, Hutkins RW. 2000. Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and Bifidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 66(6): 2682-2684.
- Kuda T, Yano, Matsuda N, Nishizawa M. 2005. Inhibitory effect of laminaran and low molecular alginate against the putrefactive compound produced by intestinal microflora in vitro and in rats. *Journal of Food Chemistry*. 91:745-749.
- Li M, Guangsheng L, Qingsen S, Xiuxia C, Wei L, Xiongè P, Liying Z, Yeshe Y, Guangli Y, Xin W. 2016. In vitro fermentation of alginate and its derivatives by human gut microbiota. *Anaerobe*. 39:19-15.
- Manin F. 2010. Potensi *Lactobacillus acidophilus* dan *LactoBacillus fermentum* dari saluran pencernaan ayam buras asal lahan gambut sebagai sumber probiotik. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Peternakan*. 8(5):221-228.
- Manning TS, Gibson, GR. 2004. Probiotik. *Best Practice Clinical Gastroenterology*. 18(2):287-298.
- Nuraida L, Nur RM, Didah NF, dan Hana. 2011. Metabolisme probiotik oleh kandidat probiotik isolat ASI sebagai dasar pengembangan produk sinbiotik. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 22(2):156-163.
- Pawar SN, Edgar KJ. 2012. Alginate derivatization: a review of chemistry, properties and applications. *Journal of Biomaterials*. 33:3279-3305.
- Pertami SD, Melkior P, Sefy AI, Markus BR, Wasilah. 2013. *Lactobacillus acidophilus* probiotic inhibits the growth of *Candida albicans*. *Jurnal Dentistry Indonesia*. 20(3): 64-67.
- Qiang X, Lie CY, Bing WQ. 2009. Review health benefit application of functional oligosaccharides. *Carbohydrate Polymers*. 77:435-441.
- Rahman MM, Akira I, Hiroyuki T, Takao O. 2010. Isolation and Characterization of two alginate lyase isozymes, AkAly28 and AkAly33, from common sea hare *Aplusia Kurodai*. *Journal Chemistry Biochemistry and Physiology*. 157:317-325.
- Ramnani P, Chitarrari R, Tuohy K, Grant J, Hotchkiss S, Philp K, Campbell R, Gill C, Rowland I. 2012. In vitro fermentation and prebiotic of novel low molecular weight polysaccharides derived from agar and alginate seaweeds. *Anaerobe*. 18:1-6.
- Shen H, Feng H, Yuzi L, Wengong Y. 2006. A high efficient electroporation of *Pseudomonas* sp. QDA pretreated with alginate lyase. *Journal Enzym dan Microbial Technology*. 39: 677-682.
- Subaryono dan Apriani SNKA. 2010. Pengaruh dekantasi filtrat pada proses ekstraksi alginat dari *Sargassum* sp. terhadap mutu produk yang dihasilkan. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 5(2):165-174.
- Subaryono, Peranginangin R, Fardiaz D, Kusnandar F. 2010. Pembentukan gel alginat yang diekstraksi dari *Sargassum filipendula* dan *Turbinaria decurens* menggunakan CaCO₃ dan GDL. *Jurnal Pasca dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. 5(1): 43-55.
- Subaryono, Peranginangin R, Suhartono MT, Zakaria FR. 2013. Alginate Lyase : sumber, mekanisme aktivitas dan aplikasi potensial. *Squalen Bulletin of Marine and Fisheries Postharvest and Biotechnology*. 8(3)105:116.
- Subaryono, Peranginangin R, Suhartono MT, Zakaria FR. 2016. Produksi oligosakarida alginat (OSA) dari rumput laut coklat lokal *Sargassum* sp. dan aktivitas biologisnya sebagai senyawa imunomodulator. [disertasi]. Bogor (ID): Fakultas ilmu dan Teknologi Pangan, IPB.
- Terakado S, Ueno M, Tamura Y, Toda N, Yoshinaga M, Otsuka K, Numabe A,

- Kawabata Y, Murota I, Sato N, Uehara Y. 2012. Sodium Alginate oligosaccharides attenuate hypertension and associated kidney damage in Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet. *Journal of Clinical and Experimental Hypertension*. 34(2):99-106.
- Wang Y, Han F, Hu B, Li J, Yu W. 2006a. In vivo prebiotic properties of Alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. *Journal of Food and Nutrition Research*. 26(1): 597– 603.
- Wang YH, Yu GL, Wang XM, Ly ZH, Zhao X, Wu ZH, Ji WS. 2006b. Purification and characterization of alginate lyase from marine *Vibrio* sp. YWA. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 38(9):633-638.
- Wong TY, Preston LA, Shiller NL. 2000. Alginate lyase: review of major sources and enzyme characteristics, structure-function analysis, biological roles, and applications. *Annual Review of Microbiology Journal*. 54(1):289-340.
- Yamamoto S, Sahara T, Sato D, Kawasaki K, Ohgiya S, Inoue A, Ojima T. 2008. Catalytically important amino-acid residues of abalone alginate lyase HdAly assessed by site-directed mutagenesis. *Enzym dan Microbial Technology*. 43:396-402.
- Zhu B, Haidong T, Yuqi Q, Qingsong X, Yuguang D, Heng Y. 2015. Characterization of a new endo-type alginate lyase from *Vibrio* sp. W13. *International Biological Macromolecules*. 75: 330-337.