

PENGARUH SUMBER KARBON TERHADAP PRODUKSI ENZIM INULINFRUKTOTRANSFERASE DARI *Nonomuraea* sp

Yetti Mulyati I¹, Sri Pudjiraharti¹, Een Sri Endah¹, Tanaka², Teruo Sone² dan Asano K².

¹Pusat Penelitian Kimia LIPI, Jl.Sangkuriang 21/544 Bandung 40135

²Laboratory of Applied Microbiology *) Hokkaido University Sapporo, Japan

Diterima : 28 Juni 2011 ; Disetujui : 3 Juli 2011

ABSTRAK

Tujuan dari penelitian ini adalah memproduksi enzim inulinfruktotransferase dengan memanfaatkan potensi bakteri golongan Aktinomisetes yang diisolasi dari tanah alam Indonesia untuk memproduksi Difruktoanhydride (DFA III), yang mana senyawa ini memiliki aktifitas fisiologis untuk meningkatkan absorpsi kalsium pada usus tikus, sapi dan manusia sehingga dapat diaplikasikan sebagai bahan pencegah osteoporosis. Proses produksi enzim inulinfruktotransferase dari *Nonomuraea* sp secara fermentasi skala labu kocok dengan mempelajari pengaruh konsentrasi sumber karbohidrat inulin dan konsentrasi sumber nitrogen telah dilakukan. Enzim tersebut memiliki suhu optimum 650°C, lebih tinggi dari suhu optimum enzim lain yang pernah diketemukan sebelumnya dan aktivitasnya tetap stabil setelah dipanaskan pada suhu 700°C selama 20 menit. Oleh karena itu enzim tersebut berpotensi untuk diaplikasikan pada skala industri. Hasil pengamatan optimasi komposisi media untuk proses produksi enzim inulinfruktotransferase dari *Nonomuraea* sp menunjukkan bahwa kondisi yang diperoleh pada suhu 300°C, waktu inkubasi 48 jam, dengan sumber karbon inulin sebesar 20 g/L, sumber nitrogen 5 g/L, medium tanpa yeast ekstrak mempunyai aktifitas enzim inulinfruktotransferase sebesar 7,3 Unit/mL. Namun jika dalam medium ditambahkan yeast ekstrak sebesar 0.2 g/L maka diperoleh aktivitas enzim inulinfruktotransferase sebesar 14,6 Unit/mL.

Kata kunci : Enzim inulinfruktotransferase, *Nonomuraea* sp, inulin, yeast ekstrak, DFA III

ABSTRACT

The aims of this research is to produce inulinfructotransferase enzyme with potentially benefit of bacteria Actinomycetes which was isolated from Indonesia soils to produce Difrucoanhydride-III (DFA III), a compound has physiology activities to enhance calcium absorption of rats, cows and human colons so that the materials can be applied as antiosteoporosis. The processing of inulinfructotransferase enzyme from *Nonomuraea* sp by using shake flask level and study the influence of carbohydrate source were conducted. This enzyme has optimum temperature at 650°C, higher than optimum temperature which has found before and the activities was stable at 700°C for 20 minutes. So that the enzyme has potentially applicable for industry scale. The results indicated that optimization condition for processing inulinfructotransferase enzyme of *Nonomuraea* sp: temperature 300°C, incubation time 48 hours, carbon source of inulin 20 g/L, nitrogen source 5 g/L, no yeast extract added, the enzyme activities was 7,3 Unit/mL. However, when medium contains yeast extract 0,2 g/L, the inulinfructotransferase enzyme activity was 14,6 Unit/mL.

Key words : Inulinfructotransferase enzyme, *Nonomuraea* sp, inulin, yeast extract, DFA II

PENDAHULUAN

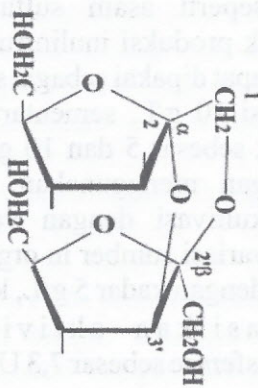
Penyakit osteoporosis pada umumnya terjadi pada wanita pascamenopause dan usia lanjut (osteoporosis primer), namun dapat pula terjadi pada wanita dan pria usia produktif. Hal ini dapat disebabkan oleh karena pola makan dengan diet kalsium rendah, gaya hidup kurang aktifitas fisik

(olah raga), faktor genetik dan dapat pula disebabkan akibat pengobatan glukokortikoid jangka panjang (osteoporosis sekunder). Osteoporosis jenis terakhir ini semakin banyak ditemukan dengan semakin meningkatnya penggunaan glukokortikoid jangka lama untuk pengobatan berbagai penyakit kronis, keganasan dan paskatransplantasi. Obat-obatan glukokortikoid menyebabkan terjadinya gangguan absorpsi kalsium seperti halnya gejala yang terjadi pada wanita pasca menopause dan usia lanjut⁽¹⁾. Hasil penelitian yang dilakukan oleh Puslitbang Gizi Depkes 2006 menyatakan, dua dari lima orang Indonesia terserang osteoporosis. Angka ini lebih tinggi dari prevalensi dunia, yaitu satu dari tiga orang di dunia berisiko terkena osteoporosis. Hal ini juga didukung oleh Indonesian White Paper yang dikeluarkan Perhimpunan Osteoporosis Indonesia (Perosi) pada tahun 2007, dimana osteoporosis pada wanita di atas 50 tahun mencapai 32,3% sementara pada pria di atas 50 tahun mencapai 28,8%⁽²⁾.

DFA III merupakan senyawa oligosakarida yang dapat kategorikan sebagai bahan pangan. Melalui serangkaian penelitian, senyawa tersebut telah dibuktikan dapat meningkatkan absorpsi kalsium pada usus tikus dan manusia^(3,4,5). Dengan demikian DFA III dapat diaplikasikan untuk pengembangan makanan fungsional maupun sebagai food supplement pencegah osteoporosis. Enzim inulinfruktotransferase (EC4.2.2.18), yaitu suatu enzim golongan heksosiltransferase yang bekerja mengkatalisis penguraian inulin menjadi DFA III dan telah diketahui dapat dihasilkan oleh bakteri genus *Arthrobacter* dan *Bacillus* sp.⁽⁵⁾ Enzim tersebut merupakan enzim induktif, oleh karena itu pada proses fermentasi diperlukan induser.

Proses produksi enzim pada umumnya dilakukan melalui beberapa tahap, hal ini terutama disebabkan oleh karena faktor-faktor yang diperlukan untuk pertumbuhan optimum mikroorganisme dapat berbeda dengan produksi enzim. Parameter tersebut meliputi kandungan nutrisi, pH, suhu, aerasi, waktu fermentasi, pengocokan dan kontrol terhadap adanya kontaminasi selama proses fermentasi. Dengan cara memanipulasi komposisi media dan kondisi

pertumbuhan produksi enzim dapat ditingkatkan. DFA III (di-D-fruktofuranosa 1,2':2,3' dianhidrida) secara struktur adalah suatu senyawa disakarida siklik yang terdiri dari dua buah residu fruktosa yang terikat melalui kedua atom karbon pereduksi membentuk struktur lingkaran dioksan intramolekul (Gambar 1). Adanya struktur dioksan membuat senyawa DFA III sangat stabil dan tidak dapat dimetabolisme oleh sistem pencernaan dalam usus kecil. Namun DFA III dapat diassimilasi oleh mikroflora yang terdapat dalam usus besar serta mempengaruhi komposisi mikroflora tersebut.⁽⁶⁾ Sebagai suatu disakarida, DFA III tidak lagi mempunyai gugus pereduksi, larut baik dalam air, memiliki kemanisan hampir setengah kali sukrosa dan tidak bersifat kariogenik (tidak menyebabkan karies gigi). Sebagai gula nonpereduksi, DFA III terbukti tidak mengakibatkan kenaikan kadar gula darah sehingga disebut sebagai pemanis rendah kalori⁽⁷⁾. DFA III juga dilaporkan dapat meningkatkan absorpsi besi pada tikus yang diinduksi anemia⁽⁸⁾. Aktifitas fisiologi DFA III yang memiliki arti sangat penting bagi kesehatan tubuh yaitu meningkatkan absorpsi kalsium pada usus tikus, sapi dan manusia sehingga dapat diaplikasikan sebagai bahan pangan pencegah osteoporosis^(3,4,5,6).membentuk struktur lingkaran dioksan intramolekul (Gambar 1). Adanya struktur dioksan membuat senyawa DFA III sangat stabil dan tidak dapat dimetabolisme oleh sistem pencernaan dalam usus kecil. Namun DFA III dapat diassimilasi oleh mikroflora yang terdapat dalam usus besar serta mempengaruhi komposisi mikroflora tersebut.⁽⁶⁾ Sebagai suatu disakarida, DFA III tidak lagi mempunyai gugus pereduksi, larut baik dalam air, memiliki kemanisan hampir setengah kali sukrosa dan tidak bersifat kariogenik (tidak menyebabkan karies gigi). Sebagai gula nonpereduksi, DFA III terbukti tidak mengakibatkan kenaikan kadar gula darah sehingga disebut sebagai pemanis rendah kalori⁽⁷⁾. DFA III juga dilaporkan dapat meningkatkan absorpsi besi pada tikus yang diinduksi anemia⁽⁸⁾. Aktifitas fisiologi DFA III yang memiliki arti sangat penting bagi kesehatan tubuh yaitu meningkatkan absorpsi kalsium pada usus tikus, sapi dan manusia sehingga dapat diaplikasikan sebagai bahan pangan pencegah osteoporosis^(3,4,5,6)



Gambar 1. Struktur kimia DFA III dalam usus besar.

DFA III dapat dibuat melalui cara kimia maupun secara enzimatik dari inulin. Pada metoda kimia digunakan asam sulfat encer⁽⁹⁾ atau kondisi pirolisis⁽¹⁰⁾ dengan rendemen mencapai 40% dalam karamel hasil reaksi. Sebaliknya pada produksi DFA III secara enzimatik, reaksinya sangat spesifik sehingga rendemen yang diperoleh lebih tinggi mencapai 80%.⁽¹¹⁾

BAHAN DAN METODA

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian antara lain medium pertumbuhan mikroba, bahan uji aktifitas inulinfruktotransferase, pelat TLC silika gel G-60, pelarut organik dan *Nonomuraea* sp.

Peralatan

Alat Penunjang Lab : Inkubator, kolom kromatografi, HPLC, bejana pengembang KLT, tabung mikrosentrifuge dan alat-alat gelas seperti labu erlen meyer, gelas kimia, tabung reaksi, cawan petri, dll.

Metoda

Variasi Sumber Karbon

Kultur aktinomiset 5% (v/v) diinokulasikan ke dalam medium induksi inulin cair IIM yang terdiri dari : yeast ekstrak 0,2 %, substrat inulin 10 g/L dan kadar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 g/L, waktu inkubasi dilakukan selama 2 hari. Variasi sumber karbon yang digunakan adalah inulin, pati, sukrosa, maltosa, xylosa laktosa, dll. Inkubasi dilakukan pada suhu 30°C selama 2 hari pada inkubator berpengocok dengan kecepatan 150 rpm. Cairan kultur selanjutnya dilakukan reaksi enzimatik menggunakan substrat inulin dalam bufer sitrat –

NaOH pH 5,63, suhu 60°C selama 30 menit. Produk DFA III dideteksi secara KLT menggunakan adsorben silika gel dengan larutan pengembang campuran n.butanol-isopropanol-air dan reagen pembentuk warna anisaldehyda- H_2SO_4 dibandingkan dengan standar.⁽¹²⁾

Variasi Sumber Nitrogen

Medium variasi sumber nitrogen yang terdiri dari : urea, NH_4Cl , NH_4NO_3 dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, dilakukan dalam skala labu kocok 250 ml dengan kadar garam ammonium sebesar 5g/L dan 10 g/L, volume media 50 mL serta proses fermentasi dilakukan pada suhu 30° C, pengadukan pada 150 rpm, dengan waktu inkubasi selama 48 jam Substrat inulin yang digunakan adalah 10 g/L.

Variasi Substrat Inulin

Variasi substrat inulin 10 dan 20 g/L, variasi kadar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 dan 10 g/L. dilakukan untuk mencari kadar inulin yang optimal dalam menghasilkan aktivitas enzim inulinfruktotransferase dalam proses fermentasi.

Preparasi Inulinfruktotransferase

Kultur aktinomiset diinokulasikan ke dalam medium aktivasi cair SR III yang mengandung inulin sebagai substrat 10 dan 20 g/L dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam pada inkubator berpengocok dengan kecepatan 150 rpm.

Uji Aktivitas Enzim Inulinfruktotransferase

Sejumlah crude supernatan 0,5 ml ditambah 0,5 mL 10% (b/v) inulin, 20 mM asam sitrat – NaOH buffer pH 5,5. Inkubasi dilakukan selama 10 menit, pada suhu 65° C. Produk DFA III yang dihasilkan dalam reaksi enzim dideteksi dengan KLT, menggunakan adsorben silika gel dengan larutan pengembang campuran n butanol-isopropanol-air dan reagen pembentuk warna anisaldehyda- H_2SO_4 dibandingkan dengan DFA III standar dan analisis kuantitatif dengan metode HPLC.⁽¹²⁾

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengamatan fermentasi terhadap variasi sumber karbon dengan penambahan yeast ekstrak 0.2 % dan menggunakan kultur koloni tunggal strain *Nonomuraea* sp disajikan pada Tabel 1. Aktivitas enzim yang diamati diperoleh dari supernatan setelah pemisahan dari biomasa hasil fermentasi. Ekstraseluler enzim

inulinfruktotransferase dalam media fermentasi dengan variasi sumber karbon tidak menunjukkan adanya aktivitas enzim, kecuali sumber karbon yang digunakan yaitu inulin. Sementara pada medium yang menggunakan asam asetat sebagai sumber karbon tidak terdeteksi adanya pertumbuhan bakteri *Nonomuraea* sp sehingga tidak terdeteksi adanya aktivitas enzim inulinfruktotransferase. Untuk pertumbuhan dalam medium yang mengandung inulin sebagai sumber karbon menunjukkan adanya pertumbuhan *Nonomuraea* sp yang sangat baik dengan pH 7.9. dan hasil pengujian menunjukkan aktivitas enzim inulinfruktotransferase sebesar 14,6 Unit/mL.

Tabel 1. Variasi Sumber Karbon Terhadap Aktivitas Enzim Inulinfruktotransferase dengan yeast ekstrak 0.2 g/L.

No.	Sumber Karbon	pH	Pertumbuhan	Aktivitas Enzim IFI (Unit/mL)
1	Inulin	7.9	+++++	14.6
2	Pati	7.5	+	T.A
3	Sukrosa	7.7	++	T.A
4	Fruktosa	7.7	++	T.A
5	Glukosa	7.9	+++	T.A
6	Maltosa	7.5	+++	T.A
7	Laktosa	7.4	+++	T.A
8	Xylosa	7.0	+	T.A
9	Glyserol	7.4	+	T.A
10	As.Asetat	8.5	-	T.A

Inulin merupakan sumber karbon terbaik untuk produksi enzim inulinfruktotrasferase dari *Nonomuraea* sp. Sementara penggunaan sumber karbon yang lain menunjukkan tidak terdeteksi untuk aktivitas enzim inulinfruktotransferase. Dengan kata lain, sumber karbon selain inulin kurang berpengaruh terhadap aktivitas enzim. Inulin telah dilaporkan sebagai sumber karbon yang terbaik karena inulin menginduksi produksi enzim. Medium variasi sumber nitrogen (urea, NH_4Cl , NH_4NO_3 dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) dilakukan dalam skala labu kocok 250 mL. Volume media 50 mL serta proses fermentasi pada suhu 30°C, pengadukan pada 150 rpm, waktu inkubasi selama 48 jam telah dilakukan. Pengaruh variasi sumber inorganik nitrogen dilakukan untuk menggantikan yeast ekstrak yang disajikan pada Tabel 2. Yeast ekstrak merupakan sumber nitrogen yang baik untuk pertumbuhan mikroba, namun tidaklah sesuai jika diaplikasikan di skala industri karena harga yeast ekstrak sangat mahal, sementara harga

yang murah seperti asam sulfat, yang bisa digunakan untuk produksi inulinfruktotransferase dimana inulin dapat dipakai sebagai sumber karbon pada konsentrasi 10 g/L, sementara penggunaan kadar inorganik sebesar 5 dan 10 g/L. Kultivasi dilakukan dengan menggunakan kondisi yang sama seperti kultivasi dengan variasi sumber karbon. Untuk variasi sumber in organik nitrogen, dari $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dengan kadar 5 g/L, kadar inulin 20 g/L menghasilkan aktivitas enzim inulinfruktotransferase sebesar 7,3 Unit/mL.

Tabel 2. Pengaruh Garam Ammonium Terhadap Produksi Inulinfruktotransferase dari *Nonomuraea* sp Tanpa Penambahan Yeast Ekstrak Dalam Medium

No	Sumber Nitrogen	g/L	Inulin (g/L)	pH	Pertumbuhan	Aktivitas IFT Unit/mL)
1	Urea	5	10	9.21	-	1.0
		10	10	9.44	-	0.1
		5	20	9.00	-	0.9
		10	20	9.28	-	0.1
2	NH_4Cl	5	10	5.20	++	1.7
		10	10	5.50	++	3.8
		5	20	5.03	++	6.1
		10	20	4.99	++	5.3
3	NH_4NO_3	5	10	5.35	++	2.4
		10	10	4.16	++	2.6
		5	20	5.08	++	6.1
		10	20	5.14	++	4.6
4	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5	10	5.11	++	4.2
		10	10	5.45	++	4.3
		5	20	5.35	++	7.3
		10	20	5.51	++	4.7

Pengaruh amonium sulfat $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ pada konsentrasi 5 dan 10 g/L dan kadar inulin 10 g/L. menghasilkan aktivitas enzim inulinfruktotransferase sebesar 4,2 dan 4,3 Unit/mL. Namun bila dibandingkan dengan pemakaian urea sebagai sumber nitrogen dalam media fermentasi, menunjukkan aktivitas inulinfruktotransferase lebih kecil dari 1 Unit/mL. Konsentrasi substrat dan lama waktu reaksi juga mempengaruhi perolehan rendemen. Semakin tinggi konsentrasi substrat dan lama reaksi enzimatik akan semakin tinggi rendemen. Pengaruh suhu terhadap produksi enzim inulin fruktotransferase selama fermentasi 48 jam, disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh Suhu Terhadap Produksi Inulin Fruktotransferase Dari *Nonomuraea* sp Selama 48 jam.

No	Suhu (°C)	pH	Biomasa (mL)	Aktivitas Enzim IFT (Unit/mL)
1	25	4.54	1.8	8.05
2	30	4.83	2.4	8.40
3	35	4.87	2.4	8.22
4	40	5.02	2.4	6.97
5	45	4.62	3.2	4.85

Proses produksi enzim inulin fructotransferase yang dilakukan tanpa penambahan yeast ekstrak dalam medium fermentasi pada suhu 30° C menunjukkan aktivitas enzim inulin fructotransferase tertinggi sebesar 8.40 Unit/mL dibandingkan dengan pemakaian suhu 40° dan 45° C. Pada suhu 45° C menunjukkan terjadi penurunan aktivitas enzim inulin fructotransferase. Pada proses fermentasi, aktivitas mikroorganisma sangat dipengaruhi oleh suhu lingkungan. Berbeda dengan pH dan komposisi ion, suhu lingkungan harus sama dengan suhu internal mikroorganisme. Suhu lingkungan mempengaruhi laju reaksi sel, sistem metabolisme, kebutuhan nutrisi dan komposisi sel. Mikroorganisme biasanya tumbuh pada suatu range pH tertentu, pada umumnya bakteri tumbuh pada kisaran pH 4-8. Perubahan pH sedikit saja akan mempengaruhi perubahan sistem metabolisme secara signifikan. Oleh karena itu diperlukan kontrol pH selama fermentasi. ⁽¹³⁾ Pengaruh waktu inkubasi selama proses fermentasi berlangsung terhadap produksi enzim inulinfruktotransferase disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengaruh Waktu Inkubasi Terhadap produksi Inulinfruktotransferase.

No	Waktu (Jam)	pH	Aktivitas Enzim IFT (Unit/mL)
1	0	6.88	0
2	12	6.71	5.01
3	24	4.43	7.37
4	36	4.64	8.31
5	48	4.83	8.40
6	60	4.79	7.87
7	72	4.79	7.69

Proses produksi enzim secara fermentasi pada umumnya dilakukan melalui beberapa tahap, hal ini terutama disebabkan oleh karena faktor faktor yang diperlukan untuk pertumbuhan optimum mikroorganisma dapat berbeda dengan produksi enzim antara lain yaitu lamanya waktu inkubasi. Pada sistim ini dapat diamati adanya empat tipe fasa pertumbuhan mikroorganisma yaitu fasa lag (adaptasi), fasa log (pertumbuhan dipercepat), fasa stationer dan fasa kematian. Hasil pengamatan menunjukkan aktivitas enzim inulinfruktotransferase pada waktu inkubasi 48 jam yaitu sebesar 8,40 Unit/mL pada pH 4,8 ini merupakan aktivitas enzim optimum pada 48 jam

fermentasi. Namun setelah lebih dari 48 jam waktu inkubasi terjadi penurunan aktivitas enzim inulinfruktotransferase yaitu pada waktu inkubasi 60 dan 72 jam yaitu sebesar 7,87 dan 7,69 Unit/mL. Penurunan aktivitas enzim setelah 72 jam fermentasi dapat disebabkan karena ketersediaan nutrisi dalam medium berkurang atau enzim mengalami katabolik represi.

KESIMPULAN

Formulasi medium merupakan tahap yang penting yang diperlukan untuk pertumbuhan optimum *Nonomuraea* sp. Nutrisi yang diperlukan untuk pertumbuhan dan produksi enzim adalah sumber karbon, nitrogen dan mineral. Selama proses fermentasi berlangsung enzim inulinfruktotransferase dapat dihasilkan dengan kondisi yang diperoleh pada suhu 30° C, waktu inkubasi 48 jam, dengan sumber karbon inulin sebesar 20 g/L, sumber nitrogen (NH₄)₂SO₄ 5 g/L dengan medium tanpa yeast ekstrak diperoleh aktivitas enzim inulinfruktotransferase sebesar 7,3 Unit/mL. Namun jika dalam medium ditambahkan yeast ekstrak sebesar 0.2 g/L dengan sumber karbon inulin maka diperoleh aktivitas enzim inulinfruktotransferase sebesar 14,6 Unit/mL.

DAFTAR PUSTAKA

1. H.Sanusi. Osteoporosis akibat Glukortikoid. Cermin Dunia Kedokteran, 140, 34-39 (2003)
2. Portal Nasional Indonesia 2002. WWW indonesia.go.id
3. T. Shuzuki. Various non digestible saccharides increase intracellular Calcium ion Concentration in rat Small intestinal enterocytes. British Journal of Nutrition 92, 751-755 (1998)
4. R. Mitamura, H. Hiroshi, A. Yoritaka and Chiji Hideyuki. Supplemental Feeding of Diffructose Anhydride III Restores Calcium Absorption Impaired by Ovariectomy in Rats. *J. Nutr.* 132: 3387-3393 (2002)
5. N. Shigematsu, Y. Okuhara, T. Shiomi, F. Tomita and H. Hara, Effect of Diffructose Anhydride III on calcium absorption in human. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 1011-1016 (2004)

6. K. Asano. Oligosaccharides function to promote calcium absorption and prevent osteoporosis. *Functional foods: trends and challenges*. LIPI Press. p.11-32 (2005)

7. O. C., Felicia, D. Neli, O. Mihai, *The New Low Calorie Sweetener Review. Acta Universitatis Cibiniensis*, 7, 1, 3-10 (2003)

8. T. Sato, T. Nakai, T. Aritsuka, T. Nanbu, H. Sadoya, and E. Imura. Preventive and/or therapeutic agent for calcipenia. European Patent, EP1776956. (2007)

9. E.J. Mc. Donald. The polyfructosans and difructose anhydrides. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 2, 253 (1947)

10. J. Defaye, A. Gadelle, C. Pedersen . The behaviour of d-fructose and inulin towards

anhydrous hydrogen fluids. *Carbohydr. Res.* 136, 53 (1985)

11. A. Yokota, S. Hirayama, K. Enomoto, Y. Miura, S. Takao, and F. Tomita. Production of inulin fructotransferase (Depolymerizing) by *Arthrobacter sp.* H65-7 and preparation of DFA III from inulin by the enzyme. *Journal of Fermentation and Bioeng* 72,4, 258-264 (1991)

12. E. Stahl. *Thin-Layer Chromatography, A Laboratory Handbook*. Springer International Student Edition, New York. (1967)

13. DIC. Wang, et al. *Fermentation and Enzyme Technology*. John Willey and Son. New York. 1979.

DAFTAR PUSTAKA

1. H. Samuel. Osteoporosis akibat Diabetes Mellitus. *Journal of Endocrinology*, 140, 14-19 (2003)

2. Pusat Nasional Indonesia 2002. *WWW. Indonesia.go.id*

3. T. Shozaki. Various non-digestible saccharides increase intracellular calcium ion concentration in rat small intestinal enterocytes. *British Journal of Nutrition* 92, 751-752 (1998)

4. R. Mithmore, H. Hirsch, A. Fortin, and C. Hiji. Dietary Supplemental Feeding of Different Anhydride III Ratios in Rats: Absorption Impaired by Ovarianectomy in Rats. *J. Nutr.* 132, 3387-3393 (2002)

5. W. Shigenaga, Y. Kobayashi, T. Shimizu, E. Tomita, and H. Hara. Effect of Different Anhydride III on calcium absorption in human. *Blood Purification*, 26, 68-74 (2004)

Waktu (jam)	pH	Aktivitas Enzim (U/ml)	%
0	6.88	0	0
12	6.71	2.01	2
24	6.43	7.37	7
36	6.21	8.41	8
48	6.07	8.87	8
60	6.09	7.87	8
72	6.10	7.97	8

Proses produksi enzim secara fermentasi pada umumnya dilakukan dalam bioreaktor tetap. Hal ini bertujuan disebabkan oleh karena faktor-faktor yang dipertimbangkan dalam metode dengan optimum mikroorganisma dengan berbagai waktu produksi enzim antara lain yaitu temperatur, waktu inkubasi. Pada sistem ini dapat diamanatkan bahwa proses fermentasi mikroorganisma yang digunakan (pada log (pertumbuhan mikroorganisma) fase stasioner) dan fase kematian. Hasil pengamatan menunjukkan aktivitas enzim inulinfructotransferase pada waktu inkubasi 48 jam yaitu sebesar 8,40 IU/ml pada pH 4,8 ini merupakan aktivitas enzim optimum pada 48 jam