

## Laporan Penelitian

# EFEKTIVITAS PENGEKSTRAK ISOPROPANOL, ETANOL DAN ASETON TERHADAP AKTIVITAS INULINASE YANG DIEKSTRAKSI DARI UMBI DAHLIA

Oleh:

Dra. Iryani, M.S  
Dra. Minda Azhar, M.St

NO. DAFTAR	: 13-3-2009
LOKASI	Hd
TITLE	: KKI
NO. DAFTAR	: 79 / Hd / 2009 - E. (1)
NO. DAFTAR	: 574.1925 Iry
Enzymes	

Penelitian ini dibiayai oleh:  
Dana DIPA Tahun Anggaran 2008  
Surat Perjanjian Pelaksanaan Penelitian Nomor: 1244/H35/KU/DIPA/2008  
Tanggal 2 Juni 2008

JURUSAN KIMIA  
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM  
UNIVERSITAS NEGERI PADANG  
2008

## LEMBARAN IDENTITAS DAN PENGESAHAN

1. a. Judul Penelitian : Efektivitas Pengekstrak Isopropanol, Etanol dan Aseton Terhadap Aktivitas Inulinase yang Diekstraksi dari Umbi Dahlia
- b. Bidang Ilmu : Biokimia
- c. Kategori Penelitian :
2. Ketua Peneliti
- a. Nama lengkap dan Gelar : Dra. Iryani, M.S
- b. Jenis kelamin : Perempuan
- c. Golongan/Pangkat/NIP : IIIId/Penata Tk. I/131601546
- d. Jabatan Fungsional : Lektor Kepala
- e. Kakultas/Jurusan : FMIPA / Kimia
- f. Pusat Penelitian : Universitas Negeri Padang
3. Alamat Ketua Peneliti
- a. Kantor /telepon/Fax : FMIPAUNP/07517057420/07517058772
- b. Rumah/telepon : Pratamal B.14 Lb.Buaya Padang/0751481699
4. Jumlah Tim Peneliti : 2 orang
- 5 Lokasi Penelitian : Laboratorium Kimia FMIPA UNP
6. Lama Penelitian : 6 (enam) bulan
7. Biaya Penelitian
- a. Sumber Dana : Dana DIPA Tahun Anggaran 2008
- b. Jumlah Dana : Rp. 5.000.000,- (Lima Juta Rupiah)

Mengetahui  
Dekan FMIPA UNP Padang

Drs. H. Anas Yaşın, M.A.  
NIP. 130365634

Ketua Peneliti,

Dra. Iryani, M.S.  
NIP. 131601546

Menyetujui  
Ketua Lembaga Penelitian UNP Padang

Prof. Dr. H. Anas Yaşın, M.A.  
NIP. 130365634

## ABSTRAK

Tanaman dahlia merupakan tanaman florikultura yang mempunyai nilai komersial yang cukup tinggi. Nilai komersial dari tanaman dahlia terletak pada bunga dan umbinya. Umbi dahlia mengandung enzim inulinase yang merupakan biokatalis pada reaksi hidrolisis inulin. Inulinase sangat potensial digunakan dalam industri sirup fruktosa. Enzim inulinase dapat dihidrolisis dari umbi dahlia dengan menggunakan pengeksrak an organik dan organik. Telah dilakukan ekstraksi inulinase dari umbi dahlia dengan menggunakan tiga macam pengeksrak organik yaitu : isopropanol p.a, etanol p.a dan aseton p.a. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan efektivitas pengeksrak isopropanol, etanol dan aseton terhadap aktivitas inulinase yang diekstraksi dari umbi dahlia. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen dengan menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktorial. Variabel penelitian terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Sebagai variabel bebas adalah jenis pengeksrak dan variabel terikat adalah aktivitas inulinase. Prosedur penelitian terdiri dari beberapa tahap yaitu : ekstraksi inulin dari umbi dahlia, ekstraksi inulinase dari umbi dahlia dengan pengeksrak isopropanol, etanol dan aseton, penentuan absorbansi larutan fruktosa hasil hidrolisis inulin oleh inulinase, penentuan konsentrasi fruktosa dan aktivitas inulinase. Konsentrasi fruktosa hasil hidrolisis ditentukan dengan persamaan regresi linier larutan standar fruktosa dan aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan konsentrasi fruktosa yang terbentuk permenit. Dari hasil analisis data diperoleh aktivitas inulinase pada fraksi I dengan pengeksrak etanol, isopropanol dan aseton berturut-turut adalah  $4,78 \cdot 10^{-3}$  .  $4,72 \cdot 10^{-3}$  dan  $3,54 \cdot 10^{-3}$  unit/mL. Dan aktivitas inulinase pada fraksi II dengan pengeksrak etanol, isopropanol dan aseton adalah  $3,92 \cdot 10^{-3}$ ,  $3,02 \cdot 10^{-3}$ , dan  $2,90 \cdot 10^{-3}$  unit/mL. Dari data aktivitas tersebut pengeksrak yang memberikan aktivitas tertinggi untuk inulinase adalah etanol, sehingga etanol merupakan pengeksrak yang efektif digunakan untuk mengekstraksi inulinase dari umbi dahlia.

## PENGANTAR

Kegiatan penelitian mendukung pengembangan ilmu serta terapannya. Dalam hal ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang berusaha mendorong dosen untuk melakukan penelitian sebagai bagian integral dari kegiatan mengajarnya, baik yang secara langsung dibiayai oleh dana Universitas Negeri Padang maupun dana dari sumber lain yang relevan atau bekerja sama dengan instansi terkait.

Sehubungan dengan itu, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang bekerjasama dengan Pimpinan Universitas, telah memfasilitasi peneliti untuk melaksanakan penelitian tentang *Efektivitas Pengekstrak Isopropanol, Etanol Dan Aseton Terhadap Aktivitas Inulinase yang Diekstraksi Dari Umbi Dahlia*, berdasarkan Surat Perjanjian Kontrak Nomor : 1244/H35/KU/DIPA/2008 Tanggal 2 Juni 2008.

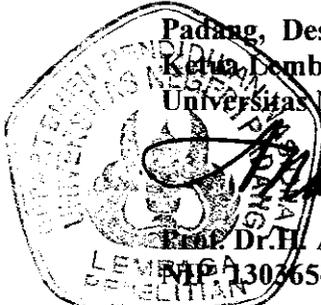
Kami menyambut gembira usaha yang dilakukan peneliti untuk menjawab berbagai permasalahan pembangunan, khususnya yang berkaitan dengan permasalahan penelitian tersebut di atas. Dengan selesainya penelitian ini, Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang akan dapat memberikan informasi yang dapat dipakai sebagai bagian upaya penting dalam peningkatan mutu pendidikan pada umumnya. Di samping itu, hasil penelitian ini juga diharapkan memberikan masukan bagi instansi terkait dalam rangka penyusunan kebijakan pembangunan.

Hasil penelitian ini telah ditelaah oleh tim pembahas usul dan laporan penelitian, kemudian untuk tujuan diseminasi, hasil penelitian ini telah diseminarkan ditingkat Universitas. Mudah-mudahan penelitian ini bermanfaat bagi pengembangan ilmu pada umumnya dan khususnya peningkatan mutu staf akademik Universitas Negeri Padang.

Pada kesempatan ini, kami ingin mengucapkan terima kasih kepada berbagai pihak yang membantu terlaksananya penelitian ini, terutama kepada pimpinan lembaga terkait yang menjadi objek penelitian, responden yang menjadi sampel penelitian, dan tim pereviu Lembaga Penelitian Universitas Negeri Padang. Secara khusus, kami menyampaikan terima kasih kepada Rektor Universitas Negeri Padang yang telah berkenan memberi bantuan pendanaan bagi penelitian ini. Kami yakin tanpa dedikasi dan kerjasama yang terjalin selama ini, penelitian ini tidak akan dapat diselesaikan sebagaimana yang diharapkan dan semoga kerjasama yang baik ini akan menjadi lebih baik lagi di masa yang akan datang.

Terima kasih.

Padang, Desember 2008  
Ketua Lembaga Penelitian  
Universitas Negeri Padang,  
  
Prof. Dr. H. Anas Yasin, M.A.  
NIP. 130765634



## DAFTAR ISI

	<b>Halaman</b>
<b>LEMBARAN IDENTITAS DAN PENGESAHAN</b> .....	i
<b>ABSTRAK</b> .....	ii
<b>PENGANTAR</b> .....	iii
<b>DAFTAR ISI</b> .....	iv
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	vi
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	vii
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	viii
<b>BAB I. PENDAHULUAN</b> .....	1
1.1. Latar Belakang Masalah .....	1
1.2. Perumusan Masalah .....	2
<b>BAB II. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	4
2.1. Umbi Dahlia .....	4
2.2. Inulin .....	5
2.3. Enzim Inulinase .....	5
<b>BAB III. TUJUAN DAN MANFAAT PENELITIAN</b> .....	9
3.1. Tujuan Penelitian .....	9
3.2. Manfaat Penelitian .....	9
<b>BAB IV. METODE PENELITIAN</b> .....	10
4.1. Jenis Penelitian .....	10
4.2. Sampel Penelitian .....	10
4.3. Alat dan Bahan .....	10
4.4. Prosedur Penelitian .....	10
4.5. Pengolahan Data dan Analisa Data .....	15

<b>BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>16</b>
5.1. Ekstrak Inulin .....	16
5.2. Ekstrak inulinase Kasar .....	16
5.3. Panjang Gelombang Maksimum Larutan Standar Fruktosa.....	17
5.4. Absorbansi Larutan standar Fruktosa.....	17
5.5. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin oleh Inulinase.....	18
5.6. Analisis Data.....	19
5.7. Pembahasan.....	20
<b>BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN .....</b>	<b>22</b>
6.1. Kesimpulan .....	22
6.2. Saran .....	22
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>23</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN .....</b>	<b>25</b>

## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Umbi Dahlia Kering .....	4
2. Desain Penelitian .....	11
3. Ekstrak Kasar Inulinase dengan Pengekstrak Aseton .....	16
4. Ekstrak Kasar Inulinase dengan Pengekstrak Isopropanol.....	16
5. Ekstrak Kasar Inulinase dengan Pengekstrak Etanol.....	16
6. Absorbansi Larutan Standar Fruktosa Pada $\lambda$ maks 749 nm.....	17
7. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase yang Diekstraksi dengan Etanol.....	18
8. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase yang Diekstraksi dengan Isopropanol.....	18
9. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase yang Diekstraksi dengan Aseton.....	18
10. Konsentrasi Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase yang Dieks traksi Dengan Etanol, Isopropanol dan Aseton.....	19
11. Aktivitas Ekstrak Inulinase dengan Variasi Pengekstrak.....	20

## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Sturuktur Inulin.....	5
2. Struktur Tersier Inulinase dari <i>Aspergillus Awamori</i> .....	6
3. Grafik Hubungan Absorbansi Larutan Fruktosa Dengan Panjang Gelombang .....	17
4. Grafik Aktivitas Ekstrak Inulinase Untuk Setiap Pengekstrak...	20

## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Skema Kerja Ekstraksi Inulin .....	25
2. Skema Kerja Pembuatan Jus Umbi Dahlia .....	26
3. Skema Kerja Ekstraksi Inulinase dengan Isopropanol.....	27
4. Skema Kerja Ekstraksi Inulinase dengan Etanol.....	28
5. Skema Kerja Ekstraksi Inulinase dengan.....	29
6. Skema Kerja Penentuan Serapan ( $\lambda$ maks) Larutan Standar Fruktosa...	30
7. Skema Kerja Penentuan Serapan Larutan Standar Fruktosa.....	31
8. Skema kerja Penentuan Aktivitas Inulinase.....	32
9. Data dan Perhitungan Persamaan Regresi Lar. Standar Fruktosa.....	33
10. Contoh Perhitungan Penentuan Aktivitas Inulinase.....	34

# BAB I

## PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Tanaman dahlia merupakan tanaman hias yang banyak terdapat didataran tinggi Sumatera Barat, seperti di daerah Bukittinggi, Padang Panjang dan Batusangkar. Tanaman ini dapat dijadikan sebagai komoditas florikultura. Selama ini nilai komersial tanaman dahlia terletak pada bunganya, tetapi dengan perkembangan ilmu pengetahuan dan teknologi pada saat ini, maka umbinya juga mempunyai nilai komersial yang jauh lebih tinggi dibanding bunganya.

Umbi dahlia mengandung enzim inulinase yang merupakan biokatalis pada reaksi hidrolisis inulin. Inulin merupakan senyawa karbohidrat yang tergolong polisakarida (polimer). Monomer inulin adalah fruktosa yang jumlahnya bervariasi tergantung sumberahlianya. Antara monomer fruktosa dihubungkan oleh ikatan glikosida  $\beta(1\rightarrow2)$  fruktosil-fruktosa membentuk fruktan. Pada ujung rantai inulin terdapat fruktosa, disamping itu dapat juga mengandung glukosa (Franck, 2003:442).

Enzim inulinase merupakan biokatalis yang sangat potensial digunakan dalam industri pembuatan sirup fruktosa dari inulin (Whiteley, 2003:1). Pembentukan sirup fruktosa dari inulin lebih menguntungkan dibandingkan dari pati, karena hidrolisis inulin hanya melibatkan satu reaksi enzimatik yaitu reaksi pemutusan ikatan glikosida antara monomer fruktosa pada inulin ( $\beta(1\rightarrow2)$  fruktosil-fruktosa) oleh enzim inulinase menghasilkan fruktosa dan atau tanpa fruktooligosakarida (FOS). Fruktosa yang dihasilkan pada proses ini di atas 95 % (Vranesic, 2001:1). Selain enzim inulinase, pemutusan ikatan  $\beta(1\rightarrow2)$  fruktosil-fruktosa pada hidrolisis inulin dapat juga digunakan senyawa asam seperti HCl dan  $H_2C_2O_4$  (Ertan, 2003:1)

Fitriani (1999) telah menghidrolisis inulin dari umbi dahlia menggunakan HCl dan  $H_2C_2O_4$ . Penggunaan enzim inulinase menghasilkan mutu produk yang jauh lebih baik dibandingkan dengan asam (Admin, 2003:1). Dengan demikian enzim ini merupakan alternatif yang tepat untuk membuat sirup fruktosa dari inulin.

Enzim inulinase juga dapat ditemukan dalam tanaman chicory, jerusalem artichoke serta pada beberapa fungi dan mikroba. Berdasarkan beberapa hasil penelitian ternyata aktivitas optimum enzim inulinase dari berbagai sumber berbeda. Enzim

inulinase yang dimurnikan dari *Aspergillus niveus* mempunyai aktivitas optimum pada pH 4,0 dan 4,8, suhu 45<sup>o</sup>C dengan medium yang mengandung 20 gL<sup>-1</sup> inulin (Souza-Motta, 2005:1). Aktivitas optimum enzim inulinase dari *Kluyveromyces marxianus* adalah pada pH 5 dan suhu 60<sup>o</sup>C (Pessoa, 1999:4-5).

Enzim inulinase dari *Aspergillus awamori* telah dipelajari secara detail. Pada enzim inulinase dari *Aspergillus awamori* ini terdapat dua residu asam amino katalitik yang penting yaitu Asp41, dan Glu 241. Asp 41 merupakan suatu katalitik nukleophile dan Glu241, suatu katalitik asam basa. Asp189 menyediakan ikatan hidrogen yang penting untuk pengenalan substrat (Nagem, 2004:1). Informasi detail enzim inulinase dari umbi dahlia belum ditemukan. Sebagai tahap awal mempelajarinya adalah melakukan ekstraksi menggunakan pelarut organik atau garam anorganik.

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh jenis pengekstrak yang digunakan dalam ekstraksi. Contohnya enzim bromelain yang diekstraksi dengan aseton dingin (-15<sup>o</sup>C) memperlihatkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan pengekstrak ammonium sulfat, metanol dan isopropanol (Heinicke, 1957: 229).

Enzim inulinase dari umbi dahlia yang diekstrak dengan etanol memberikan aktivitas optimum pada pH 5 dan suhu 55<sup>o</sup>C dengan substrat inulin 1% (Azhar,2007). Enzim inulinase dari umbi dahlia yang diekstrak dengan aseton mempunyai aktivitas optimum pada pH 5, suhu 55<sup>o</sup>C, waktu inkubasi 30 menit dan konsentrasi substrat 1% (Yulesmi, 2008: 42). Sedangkan efektivitas pengekstrak isopropanol, etanol dan aseton terhadap aktivitas inulinase yang diekstraksi dari umbi dahlia belum pernah dilaporkan. Dengan kata lain pengekstrak isopropanol, etanol dan aseton yang menghasilkan aktivitas inulinase yang paling tinggi belum diteliti. Isopropano, etanol dan aseton termasuk pelarut organik yang paling umum dan paling luas digunakan untuk mengendapkan protein (Deutscher, 1990;289; dan Scopes, 1987:57). Berdasarkan hal di atas maka dilakukan penelitian dengan judul "Efektifitas pengekstrak isopropanol, etanol dan aseton terhadap aktivitas inulinase yang diekstraksi dari umbi dahlia.

## 1.2 PERUMUSAN MASALAH

Bagaimanakah efektivitas pengekstrak isopropanol, etanol dan aseton terhadap aktivitas inulinase yang diekstraksi dari umbi dahlia.

Penelitian ini terbatas pada hal-hal berikut :

- a. Aktivitas inulinase hasil ekstraksi ditentukan pada kondisi optimumnya yaitu : pH 5, suhu 55<sup>0</sup>C, dan lama inkubasi 30 menit.
- b. Inulin dan inulinase diekstraksi dari umbi tanaman dahlia jenis bunga *decoratif formal* yang tumbuh di daerah Padang Panjang. Jenis tanaman dahlia ini banyak tumbuh di daerah tersebut

## BAB II

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1. Umbi Dahlia

Tanaman dahlia merupakan flora hias yang mempunyai potensial cukup baik untuk dikembangkan dan mempunyai nilai komersial . Selain bunganya, umbi tanaman dahlia juga mempunyai nilai komersial yang tinggi, karena mengandung inulin yang merupakan polimer alami yang dapat diolah menjadi sirup fruktosa (Rukmana,2000:10). Susunan tubuh tanaman dahlia terdiri dari umbi, batang, daun, bunga, buah dan biji. Umbi akar adalah akar yang jaringannya berubah bentuk menjadi tebal dan berubah fungsinya sebagai tempat penyimpanan cadangan makanan. Bentuk umbi dahlia bervariasi mulai dari bulat kecil sampai besar atau panjang hingga lonjong.

Struktur umbi dahlia terdiri atas kulit umbi berwarna putih kekuningan sampai kecoklatan, daging umbi tebal berwarna putih. Umbi dahlia merupakan tempat penyimpanan bahan makanan untuk tunasnya yang baru. Umbi dahlia kaya dengan inulin. Pada umbi dahlia kering kadar inulin dapat mencapai 65,7%. Selain inulin, pada umbi dahlia juga terdapat air, protein, selulosa dan lemak (Tabel 1)

Tabel 1. Komposisi umbi dahlia kering

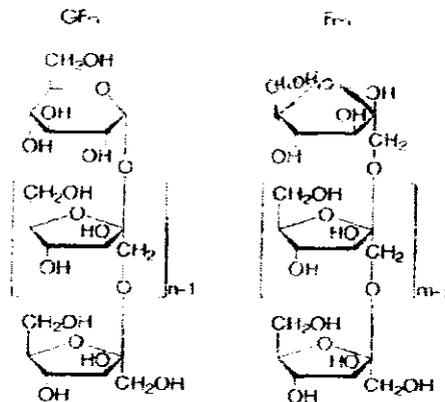
Komposisi (per 100g)	Kadar (%)
Air	2,97
Abu	4,50
Protein	3,71
Inulin	65,7
Bahan-bahan lain (selulosa, lemak dan lain-lain)	23,10

Sumber : Rukmana, 2000 : 10

#### 2. 2.Inulin

Inulin tergolong ke dalam senyawa karbohidrat jenis polisakarida dengan monomernya adalah fruktosa. Antara monomer fruktosa dihubungkan oleh ikatan glikosida  $\beta(1\rightarrow2)$  fruktosil-fruktosa membentuk fruktan . Pada struktur ujung inulin selain fruktosa juga terdapat glukosa (Franck, 2003:442). Oleh sebab itu polimer inulin dapat ditulis GF<sub>n</sub> yaitu fruktan dengan ujung terminal glukosa atau F<sub>n</sub> yaitu fruktan tanpa ujung terminal glukosa. Simbol n pada rumus tersebut adalah derajat polimerisasi

(DP).  $2 < DP \leq 10$  dikenal sebagai oligofruktosa. Inulin merupakan substrat bagi enzim inulinase. Struktur molekul inulin dimuat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur inulin  
(Frank, 2003:443)

Inulin berupa kristal putih yang dapat larut dalam air panas, tetapi hanya sedikit larut dalam air dingin atau etanol. Inulin dapat berfungsi sebagai prebiotik (Bergner,2004:1). Prinsip ekstraksi inulin dari tanaman adalah memanfaatkan kelarutan inulin dalam air dan etanol. Prinsip ekstraksi inulin dengan menggunakan etanol adalah didasarkan pada sifat inulin yang sedikit larut dalam etanol, sehingga dengan etanol inulin dapat diendapkan. Inulin mempunyai kemampuan untuk membentuk mikrokrystal jika disebar dalam air atau susu. Kristal-kristal ini tidak mengendap di dalam mulut tetapi berinteraksi untuk membentuk suatu tekstur krem yang halus (Niness,1999:2). Inulin tidak dapat dicerna oleh enzim pencernaan, sehingga inulin tidak dapat diserap oleh dinding usus halus dan inulin masuk ke usus besar tanpa terjadi perubahan struktur. Di usus besar inulin difermentasi oleh mikroba, hasil fermentasi ini bermanfaat bagi kesehatan , sehingga inulin dapat dijadikan sebagai probiotik(Bergner , 2004:1).

### 2. 3. Enzim Inulinase

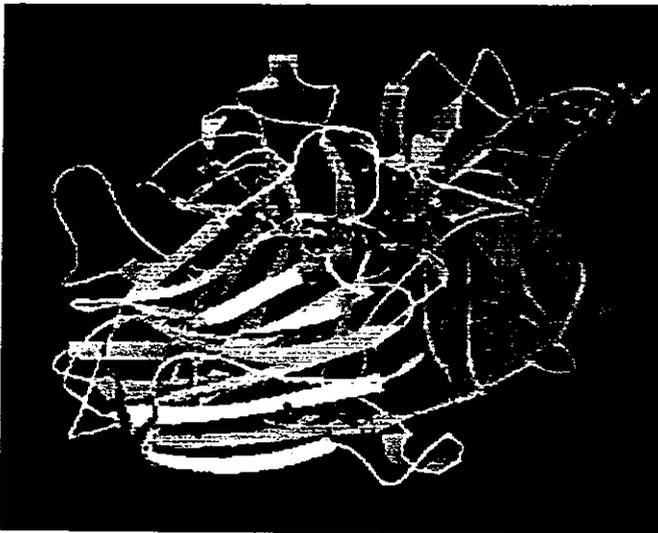
Enzim inulinase tergolong ke dalam enzim hidrolase. Enzim ini merupakan katalis pada reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada inulin. Hidrolisis inulin menghasilkan fruktosa dan atau tanpa fruktooligosakarida. Fruktosa hasil hidrolisis ini dapat

dimanfaatkan untuk pembuatan sirup fruktosa. Enzim ini dapat diekstraksi dari fungi, mikroorganisme dan tanaman yang mengandung inulin.

### 2.3.1. Struktur Enzim Inulinase

Enzim inulinase yang telah dipelajari secara detail adalah inulinase dari *Aspergillus awamori* merupakan satu untai polipeptida dengan 518 buah residu asam amino. Massa molekul relatif enzim ini adalah 57133. Pada pusat aktif enzim inulinase dari *Aspergillus awamori* terdapat dua residu asam amino katalitik yang penting yaitu : Asp41, suatu katalitik nukleophile dan Glu241, suatu katalitik asam basa. Asp189 menyediakan ikatan hidrogen yang penting untuk pengenalan substrat (Nagem, 2004:1).

Bentuk tiga dimensi enzim ini merupakan struktur sekunder dan tersier. Struktur sekunder disebabkan oleh ikatan hidrogen antara hidrogen amina dan oksigen karbonil pada ikatan peptida. Struktur tersier enzim inulinase ini di dominasi oleh struktur  $\beta$ -pleated-sheet (Gambar 2). Struktur tersier disebabkan oleh interaksi antara rantai samping residu asam amino.



Gambar.2. Struktur Tersier inulinase dari *Aspergillus Awamori*

(Sumber: Nagem,2004 :1)

### 2.3.2. Aktivitas Enzim Inulinase

Aktivitas enzim inulinase adalah kemampuan enzim inulinase dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin yang sebanding dengan fruktosa yang terbentuk pada kondisi reaksi tertentu. Semakin banyak fruktosa yang dihasilkan maka aktivitas enzim

inulinase semakin tinggi. Aktivitas inulinase dapat juga didefinisikan sebagai  $\mu\text{mol}$  fruktosa yang dihasilkan setiap menitnya pada kondisi reaksi tertentu (Gauda, 2002:4). Definisi ini dinamakan juga satu unit inulinase. Sedangkan aktivitas spesifik enzim inulinase adalah jumlah aktivitas enzim inulinase per miligram protein, semakin murni enzim inulinase tersebut maka aktivitas spesifiknya juga semakin tinggi.

Penentuan kadar fruktosa hasil hidrolisis inulin oleh enzim inulinase dapat ditentukan dengan metoda Somogyi-Nelson menggunakan alat spektrofotometer (Plummer, 1978:184-185). Fruktosa (ketosa) dalam larutan basa berada dalam kesetimbangan dengan aldosa lewat zat antara tautomerik enediol. Gugus aldehyd pada aldosa tersebut dalam suasana basa dapat dioksidasi oleh ion kupri ( $\text{Cu}^{2+}$ ) menjadi suatu asam aldonat dan ion  $\text{Cu}^{2+}$  direduksi menjadi kupro oksida ( $\text{Cu}_2\text{O}$ ). Ion kupro ( $\text{Cu}^{1+}$ ) selanjutnya direaksikan dengan reagen arsenomolibdat menghasilkan warna biru (*molybdenum blue*). Warna biru yang terbentuk diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada  $\lambda$  maksimum fruktosa. Intensitas warna biru sebanding dengan konsentrasi fruktosa dalam larutan tersebut.

Aktivitas optimum enzim inulinase dari berbagai sumber berbeda. Aktivitas optimum inulinase yang dimurnikan dari *Aspergillus niveus* adalah pH 4,0 dan 4,8, suhu  $45^\circ\text{C}$  pada medium  $20 \text{ gL}^{-1}$  inulin (De Souza-Motta, 2005: 1). Aktivitas optimal inulinase dari *Kluyveromyces marxianus* ditemukan pH 5 dan suhu  $60^\circ\text{C}$  (Pessoa, 1999:4-5). Inulinase dari *Aspergillus fumigatus*, aktivitas optimumnya adalah pH 5.5 dan suhu  $45^\circ\text{C}$  (Gouda, 2002:589).

### **2.3.3. Ekstraksi Inulinase dengan isopropanol, etanol, aseton**

Ekstraksi inulinase dari umbi dahlia dapat dilakukan dengan cara pengendapan. Proses ini berdasarkan kelarutan protein pada garam anorganik atau pelarut organik. Garam anorganik yang dapat digunakan adalah ammonium sulfat, natrium klorida dan natrium posfat. Pelarut organik yang dapat digunakan adalah metanol, etanol, isopropanol, aseton dan kloroform (Heinicke dan Gortner, 1957:229).

Jika pelarut organik seperti isopropanol, etanol atau aseton ditambahkan pada larutan yang mengandung protein (pelarut air), maka kelarutan protein turun dengan turunnya temperatur. Campuran ini tidak membeku pada  $0^\circ\text{C}$ . Pada temperatur rendah (di bawah  $10^\circ\text{C}$ ) molekul pelarut organik tidak dapat memasuki struktur internal protein

yang dapat menyebabkan ketidakstabilan struktur protein. Sebaliknya pada temperatur tinggi (di atas  $10^{\circ}\text{C}$ ) molekul organik kecil dapat memasuki celah permukaan protein yang dapat menyebabkan terjadinya denaturasi. Pada keadaan ini, molekul organik berinteraksi dengan residu asam amino internal hidropobik protein. Pada temperatur yang lebih tinggi interaksi hidropobik intramolekul pada molekul protein lebih kuat dan relatif lebih penting dalam memelihara integritas protein. Kehilangan interaksi ini dapat mengakibatkan denaturasi autokatalitik (Scopes, 1978:58). Dengan demikian protein enzim lebih mudah terdenaturasi dalam pelarut organik di atas temperatur  $10^{\circ}\text{C}$ . Oleh sebab itu suhu ekstraksi enzim dilakukan di bawah  $10^{\circ}\text{C}$  dan sebaiknya di bawah  $0^{\circ}\text{C}$

Jenis pengestrak yang digunakan mempengaruhi aktivitas enzim yang diekstraksi. Apabila permukaan enzim bersifat polar maka jenis pengestrak yang akan memberikan aktivitas yang tinggi adalah pengestrak yang bersifat polar juga. Enzim bromelain yang diekstraksi dengan aseton dingin ( $-15^{\circ}\text{C}$ ) memperlihatkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan pengestrak ammonium sulfat, metanol dan isopropanol (Heinicke, 1957: 229). Aktivitas enzim kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum* lebih tinggi menggunakan pengestrak ammonium sulfat dibandingkan pengestrak etanol, dan aseton (Wijaya, 2002:30). Pemilihan pelarut isopropanol, etanol dan aseton didasarkan pada tingkat kepolaran pelarut organik tersebut. Tingkat kepolaran etanol > isopropanol > aseton. Jika enzim inulinase yang akan diekstraksi sifat kepolarannya tinggi maka diharapkan akan mengendap lebih banyak dengan etanol . Dan sebaliknya jika sifat kepolarannya rendah , maka enzim akan lebih banyak mengendap dengan aseton.

Pengendapan protein atau enzim juga ditentukan oleh tetapan dielektrik darilarutan pengestrak. Larutan yang mempunyai tetapan dielektrik lebih besar maka akan mampu melakukan kontak lebih besar dengan molekul protein atau enzim. Etanol mempunyai tetapan dielektrik 25,00, isopropanol 18,3 dan aseton 20,7.

## **BAB III**

### **TUJUAN DAN MAMFAAT PENELITIAN**

#### **3.1. Tujuan Penelitian**

Tujuan penelitian adalah menentukan efektivitas pengestrak isopropanol, etanol dan aseton terhadap aktivitas inulinase yang diekstraksi dari umbi dahlia

#### **3.2. Manfaat Penelitian**

Penelitian ini termasuk kategori penelitian I yaitu penelitian yang memberikan kontribusi pada perkembangan IPTEK dalam bidang biokimia dan kimia pangan. Mamfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi tentang pengestrak yang menghasilkan enzim inulinase dari umbi dahlia dengan aktivitas paling tinggi. Dan enzim yang dihasilkan dapat digunakan sebagai biokatalis pada pembuatan sirup fruktosa dari inulin

## BAB IV METODE PENELITIAN

### 4.1. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang akan dilakukan di laboratorium Biokimia FMIPA UNP selama 6 bulan.

### 4.2. Variabel Penelitian

Variabel bebas penelitian ini adalah jenis pengestrak yaitu isopropanol, etanol dan aseton. Variabel terikat adalah aktivitas enzim inulinase.

### 4.3. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini adalah rancangan acak lengkap dengan satu faktor. Faktor tersebut adalah jenis pengestrak yaitu isopropanol, etanol dan aseton. Ekstraksi inulinase dilakukan 2 kali ulangan, dan setiap hasil ekstraksi ditentukan aktivitasnya sebanyak 2 kali. Desain penelitian dapat ditulis seperti yang dimuat pada Tabel 2.

Tabel 2. Desain penelitian

Pengekstraksi	Aktivitas inulinase (unit/mL)	
isopropanol		
Etanol		
Aseton		

### 4.4. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah peralatan gelas, timbangan analitik, termometer, oven, pH meter, UV-VIS, inkubator, lemari pendingin, magnetik stirer, sentrifus dan desikator. Bahan yang digunakan adalah umbi dahlia, aquades, buffer asetat, fruktosa, etanol, aseton, isopropanol, karbon aktif, ammonium molibdat, Na arsenat, KNa tartrat,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , dan  $\text{ZnSO}_4$

### 4.5. Prosedur penelitian

Langkah-langkah dalam penelitian adalah (1) Mengekstraksi inulin sebagai substrat enzim inulinase dari umbi dahlia; (2) Mengekstraksi inulinase dari umbi dahlia dengan isopropanol, etanol dan aseton; dan (3) Menentukan aktivitas inulinase pada kondisi optimumnya. Secara rinci langkah penentuan aktivitas inulinase hasil ekstraksi dengan pengestrak isopropanol, etanol dan aseton adalah sebagai berikut:

#### 4.5.1. Ekstraksi inulin

Ekstraksi inulin dari umbi dahlia dilakukan sesuai prosedur Andyani (2001) sebagai berikut : Umbi dahlia dibersihkan, dipotong, ditimbang 250 gram dan diblender dengan 500 ml aquades. Kemudian campuran ini dipanaskan pada penangas air (suhu  $87^{\circ}\text{C}$ , selama 30 menit). Setelah dingin, disaring dan diambil filtratnya. Selanjutnya filtrat sebanyak 615 mL ditambahkan etanol 30% sebanyak 246 mL. Larutan kemudian disimpan di dalam *freezer* selama 18 jam.

Larutan dibiarkan pada suhu ruang selama 2 jam lalu disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh endapan inulin basah I sebanyak 50 mL dan supernatan I sebanyak 800 mL. Endapan I dan supernatan I positif terhadap uji Seliwanof. Kemudian supernatan I ditambah etanol 30% sebanyak 320 mL dan disimpan di dalam freezer selama 18 jam. Larutan dibiarkan pada suhu ruang selama 2 jam, kemudian disentrifugasi pada kecepatan 9000 rpm selama 10 menit dan diperoleh endapan inulin basah II sebanyak 10 mL dan supernatan sebanyak 1075 mL. Endapan II dan supernatan II dengan uji Seliwanof memberikan hasil yang positif. Supernatan II ditambah etanol 30% sebanyak 430 mL dan disimpan di dalam freezer selama 18 jam, setelah itu dibiarkan pada suhu ruang selama 2 jam. Kemudian supernatan disentrifugasi dengan kecepatan 9000 rpm selama 10 menit dan diperoleh endapan inulin basah III sebanyak 1 mL dan supernatan III 1600 mL. Endapan III positif terhadap uji Seliwanof dan supernatan III negatif dengan uji Seliwanof.

Endapan inulin basah I, II dan III digabung kemudian ditambah aquades sebanyak 124 mL dan ditambah arang aktif sebanyak 1 gram, kemudian dipanaskan pada suhu  $87^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit, setelah itu disaring dengan penyaring Buchner dan diperoleh filtrat bening sebanyak 85 mL. Filtrat dikeringkan pada suhu  $56^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam dan diperoleh inulin sebanyak 6 gram. Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 1.

#### 4.5.2. Ekstraksi enzim inulinase

Metoda ekstraksi enzim inulinase disadur dari Sari (1991) yang dimodifikasi. Umbi dahlia dingin dibersihkan dan dikupas setelah itu ditimbang sebanyak 600 gram dan ditambah 300 mL buffer asetat dingin 0,2M pH 5. Setelah itu diblender, kemudian disaring dan diperoleh 50 gram residu serta 450 mL filtrat. Residu dan filtrat yang diperoleh diuji dengan reagen Biuret dan memberikan hasil positif terhadap filtrate dan

negative untuk residu. Filtrat dibagi 3 untuk dilakukan ekstraksi dengan isopropanol, etanol dan aseton. Skema kerja dapat dilihat pada lampiran 2.

#### **Ekstraksi dengan isopropanol.**

Fraksinasi I: Filtrat sebanyak 150 mL ditambahkan 150 mL isopropanol p.a dingin dan diaduk sampai homogen. Larutan ini didiamkan dalam *freezer* selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 158,7 gram dan supernatan 139 mL ( I ). Pada endapan dan supernatan dilakukan uji Biuret, keduanya memberikan hasil positif ( terbentuk warna ungu ). Endapan yang diperoleh dikeringkan dalam lemari pendingin. Endapan yang kering dilarutkan dalam 0,2M buffer asetat pH5. Fraksi cairnya digunakan untuk fraksinasi ke II dengan cara seperti fraksinasi I.

Fraksinasi II : 139 mL supernatan I ditambah 139 mL isopropanol p.a dingin, (-10<sup>0</sup>C) diaduk sampai homogeny dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 25,0013 gram dan supernatan 237mL ( II ). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang positif ( terbentuk warna ungu). Endapan yang diperoleh merupakan fraksi enzim 1

Fraksinasi III : 237 mL supernatant II ditambah 237 mL isopropanol p.a dingin, (-10<sup>0</sup>C) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 2,1667 gram dan supernatan 430 mL ( III ). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang positif ( terbentuk warna ungu). Endapan yang diperoleh merupakan fraksi enzim 2

Fraksinasi IV: 430 mL supernatan III ditambah 430 mL isopropanol p.a dingin, (-10<sup>0</sup>C) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 0,4504 gram dan supernatan 800 mL ( IV). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang negativ. Skema kerja dapat dilihat pada lampiran 3

### **Ekstraksi dengan etanol**

Fraksinasi I: Filtrat sebanyak 150 mL ditambahkan 150 mL etanol p.a dingin dan diaduk sampai homogen. Larutan ini didiamkan dalam *freezer* selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 4000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 103,5 gram dan supernatan 143 mL ( I ). Pada endapan dan supernatan dilakukan uji Biuret, keduanya memberikan hasil positif ( terbentuk warna ungu ). Endapan yang diperoleh dikeringkan dalam lemari pendingin. Endapan yang kering dilarutkan dalam 0,2M buffer asetat pH5. Fraksi cairnya digunakan untuk fraksinasi ke II dengan cara seperti fraksinasi I.

Fraksinasi II : 143 mL supernatan I ditambah 143 mL etanol p.a dingin, (- 10<sup>0</sup>C) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 22,6797 gram dan supernatan 249 mL ( II ). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang positif ( terbentuk warna ungu). Endapan yang diperoleh merupakan fraksi enzim 1

Fraksinasi III : 249 mL supernatant II ditambah 249 mL etanol p.a dingin, (- 10<sup>0</sup>C) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 5,3008 gram dan supernatan 450 mL ( III ). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang positif ( terbentuk warna ungu). Endapan yang diperoleh merupakan fraksi enzim 2

Fraksinasi IV: 450 mL supernatan III ditambah 450 mL etanol p.a dingin, (- 10<sup>0</sup>C) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 0,4504 gram dan supernatan 900 mL ( IV). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang negatif. Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 4

### **Ekstraksi dengan aseton**

Fraksinasi I: Filtrat sebanyak 150 mL ditambahkan 150 mL aseton p.a dingin dan diaduk sampai homogen. Larutan ini didiamkan dalam *freezer* selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 107,64 gram dan supernatan 143 mL ( I ). Pada endapan dan supernatan dilakukan uji Biuret, keduanya

memberikan hasil positif ( terbentuk warna ungu ). Endapan yang diperoleh dikeringkan dalam lemari pendingin. Endapan yang kering dilarutkan dalam 0,2M buffer asetat pH5. Fraksi cairnya digunakan untuk fraksinasi ke II dengan cara seperti fraksinasi I.

Fraksinasi II : 143 mL supernatan I ditambah 143 mL aseton p.a dingin, ( $- 10^{\circ}\text{C}$ ) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 23,6143 gram dan supernatan 200 mL ( II ). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang positif ( terbentuk warna ungu). Endapan yang diperoleh merupakan fraksi enzim I

Fraksinasi III : 200 mL supernatan II ditambah 200mL aseton p.a dingin, ( $- 10^{\circ}\text{C}$ ) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 2,0163 gram dan supernatan 357mL ( III ). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang positif ( terbentuk warna ungu). Endapan yang diperoleh merupakan fraksi enzim II

Fraksinasi IV: 357 mL supernatan III ditambah 357mL aseton p.a dingin, ( $- 10^{\circ}\text{C}$ ) diaduk sampai homogen dan disimpan di dalam freezer selama 24 jam. Larutan disentrifugasi pada 9000 rpm selama 15 menit dan diperoleh endapan 0,203 gram supernatan 800 mL ( IV). Uji Biuret terhadap endapan dan supernatan memberikan hasil yang negatif. Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 5

#### **4.5.3. Pengukuran absorbansi larutan standar fruktosa**

Larutan standar fruktosa ditentukan absorbansinya sesuai prosedur Nelson's (Alexander, 1993:57). Langkah pertama adalah menentukan  $\lambda$  maksimum fruktosa dengan menggunakan larutan standar fruktosa 30 ppm. Absorbansi diukur pada variasi  $\lambda$  500-800 nm. Absorbansi larutan standar fruktosa dilakukan pada  $\lambda$  maksimum larutan fruktosa. Pada masing-masing tabung reaksi dimasukkan 1mL larutan standar fruktosa dengan variasi konsentrasi 10,20,30,40,dan50 ppm. Kemudian ke dalam setiap tabung reaksi ditambahkan 1 mL reagen Nelson's tabung reaksi ditutup dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Larutan segera didinginkan sampai suhu kamar ( $25^{\circ}\text{C}$ ). Selanjutnya pada larutan ditambahkan 1 mL reagen Arsenomolibdat ,

diaduk dan dibiarkan beberapa menit sampai gas CO<sub>2</sub> hilang. Selanjutnya ditambahkan aquades 7 mL dan absorbansi diukur pada  $\lambda$  749 nm ( $\lambda$  maks). Sebagai blanko adalah aquades yang diperlakukan sama seperti sampel. Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 6

#### 4.5.4. Aktivitas enzim inulinase dari umbi dahlia

Penentuan aktivitas inulinase dilakukan sesuai metoda Somogyi-Nelson (Plummer, 1978:184-185). Inulin 1% (b/v) sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam sederetan tabung reaksi. Pada masing-masing tabung reaksi ditambahkan 1 mL enzim inulinase 1 mg/mL larutan 0,2M buffer asetat pada pH 5 (hasil ekstraksi dengan isopropanol, etanol dan aseton). Tabung reaksi tersebut diinkubasi selama 30 menit. Reaksi enzimatis diinaktifkan dengan mencelupkan tabung reaksi ke dalam air mendidih selama 30 menit. Setelah dingin ditambahkan 1,5 mL larutan 0,3N Ba(OH)<sub>2</sub>, dikocok, kemudian ditambahkan 1,5 mL ZnSO<sub>4</sub> 5%, dikocok sampai homogen dan dibiarkan selama 5 menit. Setelah itu disentrifus selama 20 menit, filtratnya yang bening (bebas protein) dipisahkan.

1 mL filtrat bebas protein ditambahkan 1 mL reagen Nelson's, tabung reaksi ditutup dan dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Larutan segera didinginkan sampai suhu kamar (25<sup>0</sup>C). Pada larutan tersebut ditambahkan 1 mL reagen arsenomolibdat, diaduk dan dibiarkan beberapa menit sampai buih hilang. Selanjutnya ditambahkan aquades 7 mL, absorbansi diukur pada  $\lambda$  749 nm ( $\lambda$  maksimum). Sebagai blanko adalah aquades yang diperlakukan sama seperti sampel. Sebagai kontrol adalah larutan inulin 1% ditambah air 1 mL dan diperlakukan sama seperti sampel. Skema kerja dapat dilihat pada Lampiran 7

#### 4. 6. Pengolahan dan Analisis Data

Data absorbansi larutan fruktosa hasil hidrolisis inulin akibat aktivitas enzim inulinase hasil ekstraksi dengan pengekrak isopropanol, etanol dan aseton, ditentukan kadar fruktosanya dengan menggunakan persamaan regresi larutan standar fruktosa yaitu :  $Y = \alpha + \beta X$  . Untuk menentukan aktivitas inulinase adalah dengan cara menghitung mol atau mikromol fruktosa yang dihasilkan di bagi dengan waktu inkubasi

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{\mu\text{mol fruktosa}}{\text{Waktu inkubasi}}$$

**BAB V**  
**HASIL DAN PEMBAHASAN**

**5.1. Ekstrak Inulin**

Dari penelitian yang telah dilakukan diperoleh inulin sebanyak 6,0 gram dari 250 gram umbi dahlia. Untuk uji kualitatif inulin dilakukan dengan uji Seliwanof, diperoleh hasil positif yang ditandai terbentuknya warna merah pada larutan.

**5.2. Ekstrak Inulinase Kasar**

Inulinase diekstraksi menggunakan pelarut aseton, isopropanol dan etanol dingin (suhu dibawah 0°C) sesuai prosedur Ulam Sari yang telah dimodifikasi.

Dari 200 gram umbi dahlia untuk masing-masing pelarut diperoleh inulinase kasar seperti yang terdapat pada Tabel 3,4 dan 5 berikut:

**Tabel.3. Ekstrak Kasar Inulinase Dengan Pelarut aseton**

Fraksi	Berat ekstrak enzim (gram)	Uji Biuret
1	23,6143	+
2	2,0163	+

**Tabel.4. Ekstrak Kasar Inulinase Dengan Pelarut isopropanol**

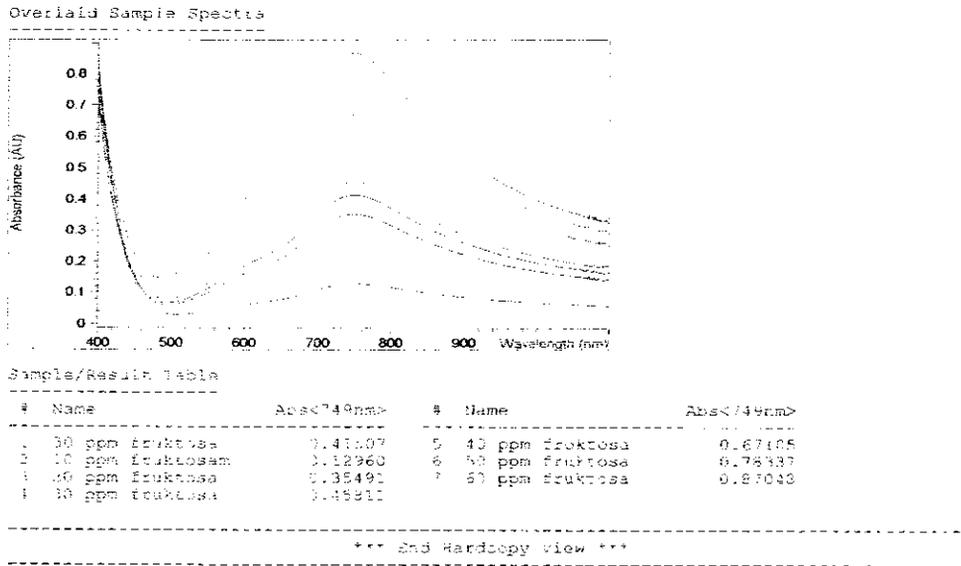
Fraksi	Berat ekstrak enzim (gram)	Uji Biuret
1	25,1003	+
2	2,1667	+

**Tabel.5. Ekstrak Kasar Inulinase Dengan Pengekstrak etanol**

Fraksi	Berat ekstrak enzim (gram)	Uji Biuret
1	22,6797	+
2	2,0008	+

### 5.3. Panjang gelombang Maksimum Larutan Standar Fruktosa

Panjang gelombang maksimum larutan standar fruktosa ditentukan dengan variasi panjang gelombang 500 sampai 800 nm dengan konsentrasi fruktosa 30 ppm. Dari hasil pengukuran diperoleh  $\lambda$  maks 749 nm. Grafik hubungan absorbansi dengan panjang gelombang seperti Gambar.3 beriku

79/hd/2009-E<sub>1</sub>(1)

Gambar.3. Grafik hubungan absorbansi larutan fruktosa dengan panjang gelombang

### 5.4. Absorbansi Larutan Standar Fruktosa

Absorbansi larutan standar fruktosa diukur pada  $\lambda$  maks. 749 nm. Konsentrasi larutan standar yang digunakan 10 – 50 ppm. Absorbansi larutan standar fruktosa hasil pengukuran dapat dilihat pada Tabel 6 berikut

Tabel.6. Absorbansi Larutan Standar Fruktosa pada  $\lambda$  maks. 749 nm

No	Konsentrasi larutan fruktosa (ppm)	Absorbansi
1	10	0,12960
2	20	0,25449
3	30	0,39384
4	40	0,61522
5	50	0,86114

### 5.5. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase

Inulinase yang digunakan untuk menghidrolisis inulin adalah inulinase hasil ekstraksi dengan aseton, etanol dan isopropanol. Hidrolisis dilakukan dengan waktu inkubasi 30 menit, pH 5, suhu 55°C dan konsentrasi inulin 1%. Absorbansi larutan fruktosa hasil hidrolisis dapat dilihat pada Tabel 7,8 dan 9

**Tabel.7. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase Yang Diekstraksi Dengan Etanol**

Fraksi	Absorbansi (A <sub>1</sub> )	Absorbansi (A <sub>2</sub> )	Rerata A <sub>1</sub>	Rerata A <sub>2</sub>	Rerata A <sub>1</sub> dan A <sub>2</sub>
I	0,640 0,636	0,640 0,646	0,638	0,643	0,6405
II	0,592 0,598	0,519 0,514	0,595	0,5160	0,5557
Kontrol	0,264 0,265	0,267 0,264	0,265	0,265	0,265

**Tabel.8. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase Yang Diekstraksi Dengan Isopropanol**

Fraksi	Absorbansi (A <sub>1</sub> )	Absorbansi (A <sub>2</sub> )	Rerata A <sub>1</sub>	Rerata A <sub>2</sub>	Rerata A <sub>1</sub> dan A <sub>2</sub>
I	0,636 0,636	0,632 0,632	0,636	0,632	0,634
II	0,476 0,476	0,458 0,456	0,476	0,457	0,466
Kontrol	0,264 0,265	0,267 0,264	0,265	0,265	0,265

**Tabel.9. Absorbansi Larutan Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase Yang Diekstraksi Dengan Aseton**

Fraksi	Absorbansi (A <sub>1</sub> )	Absorbansi (A <sub>2</sub> )	Rerata A <sub>1</sub>	Rerata A <sub>2</sub>	Rerata A <sub>1</sub> dan A <sub>2</sub>
I	0,516 0,518	0,522 0,522	0,517	0,522	0,518
II	0,456 0,456	0,458 0,450	0,456	0,454	0,455
Kontrol	0,264 0,265	0,267 0,264	0,265	0,265	0,265

## 5.6 Analisis Data

### 5.6.1. Penentuan Persamaan Regresi Larutan Standar Fruktosa

Data absorbansi larutan standar pada variasi konsentrasi dianalisa dengan persamaan regresi linier :  $Y = \alpha + \beta X$ , Dari hasil analisa diperoleh harga :

$$\alpha = -0,096343 \text{ dan } \beta = 0,0182381 \text{ dan } r = 0,988597$$

Persamaan regresi linier larutan standar fruktosa adalah :

$$Y = -0,096343 + 0,0182381X$$

Data dan perhitungan regresi linier dari larutan standar fruktosa dapat dilihat pada lampiran 7

### 5.6.2. Konsentrasi Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin oleh Inulinase

Konsentrasi fruktosa hasil hidrolisis ditentukan berdasarkan harga absorbansinya yang dianalisis dengan persamaan regresi linier dari larutan standar fruktosa yaitu :  $Y = -0,096343 + 0,0182381X$ . Contoh perhitungan terdapat pada Lampiran . Dari hasil analisis diperoleh konsentrasi fruktosa seperti yang tertera pada Tabel 10 berikut.

**Tabel.10. Konsentrasi Fruktosa Hasil Hidrolisis Inulin Oleh Inulinase Yang diekstraksi Dengan Variasi Pengekstrak**

Ekstrak Enzim	Larutan Pengekstrak	Konsentrasi Fruktosa ( $\mu\text{g/ml}$ )
Fraksi I II	Etanol	25,8712 21,2216
Fraksi I II	Isopropanol	25,5148 16,3034
Fraksi I II	Aseton	19,1545 15,7002

### 5.6.3. Aktivitas Ekstrak Inulinase.

Aktivitas ekstrak inulinase dinyatakan sebagai  $\mu\text{mol}$  fruktosa yang dihasilkan permenit. Untuk menentukan harga aktivitas ekstrak inulinase digunakan rumus :

$$\text{Aktivitas ekstrak inulinase} = \frac{X}{\text{Mr Fruktosa}} \times \frac{I}{t}$$

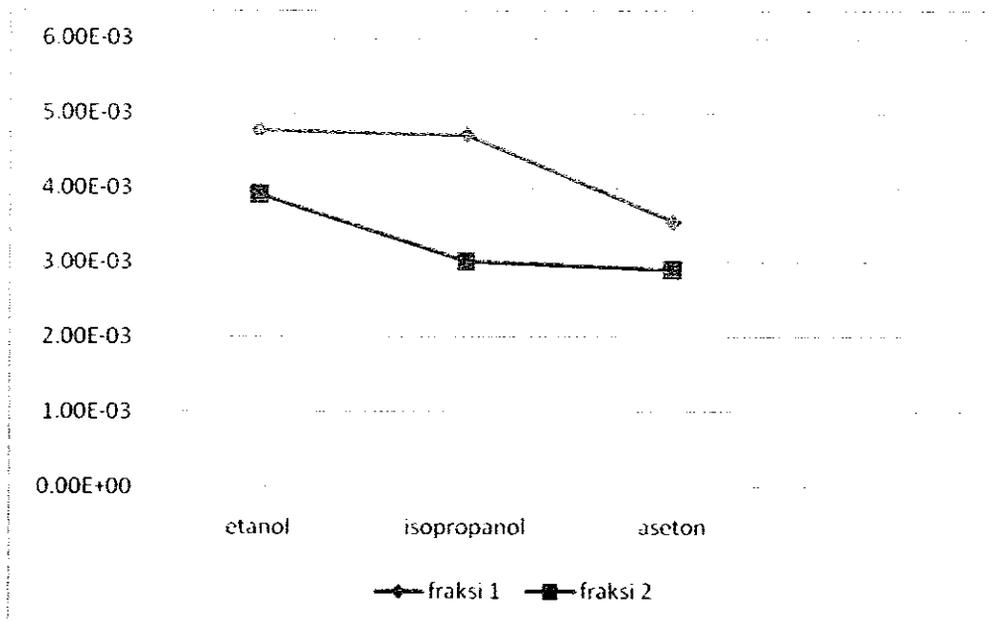
X= konsentrasi fruktosa ( $\mu\text{g/ml}$ )

t = waktu inkubasi (menit)

Dari hasil analisis diperoleh aktivitas ekstrak inulinase pada variasi larutan pengekstrak seperti yang tertera pada Tabel 11 berikut. Grafik aktivitas inulinase untuk fraksi I dan II dengan pengekstrak etanol, isopropanol dan aseton dapat dilihat pada Gambar 4. Contoh perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 8

**Tabel.11. Aktivitas Ekstrak Inulinase dengan Pengekstrak Etanol, Isopropanol dan Aseton**

Ekstrak Enzim	Larutan Pengekstrak	Aktivitas Ekstrak Inulinase (unit/ml)
Fraksi I II	Etanol	$4,78 \cdot 10^{-3}$
		$3,92 \cdot 10^{-3}$
Fraksi I II	Isopropanol	$4,72 \cdot 10^{-3}$
		$3,02 \cdot 10^{-3}$
Fraksi I II	Aseton	$3,54 \cdot 10^{-3}$
		$2,90 \cdot 10^{-3}$



**Gambar 4. Grafik Aktivitas Ekstrak Inulinase Untuk Setiap Larutan Pengekstrak**

### 5.7. Pembahasan

Inulinase yang diperoleh pada masing-masing larutan pengekstrak masih dalam bentuk ekstrak kasar. Dari hasil penelitian, diperoleh ekstrak kasar enzim inulinase untuk fraksi I dengan pengekstrak isopropanol, aseton dan etanol masing-

masing adalah : 25,1003 gram, 23,6143 gram dan 22,6797 gram. Dari hasil uji biuret untuk ketiga endapan fraksi I memberikan uji positif terhadap protein dengan kepekatan warna ungu yang berbeda. Endapan dengan pengeksrak etanol memberikan warna yang lebih pekat dibandingkan dengan isopropanol dan aseton, meskipun jumlah endapannya lebih sedikit. Warna ungu timbul karena terbentuknya kompleks  $\text{Cu}^{2+}$  dari reagen Biuret dengan empat atom nitrogen pada untai peptide atau protein dalam larutan alkali (Clark, 1977 : 75). Hal ini menandakan bahwa kandungan protein dari ekstrak etanol lebih tinggi. Apabila data ini kita hubungkan dengan data aktivitas ekstrak inulinase, ternyata mempunyai korelasi yang linier, dimana aktivitas ekstrak inulinase tertinggi adalah hasil ekstraksi dengan etanol, seperti yang tertera pada Tabel 11. Aktivitas ekstrak inulinase dari ketiga pengeksrak menurun dengan berkurangnya sifat kepolaran dari pengeksrak, hal ini berarti bahwa inulinase pada umbi dahlia mempunyai residu asam amino dengan R polar, seperti inulinase dari *Aspergillus Awamori* dimana mengandung residu katalitik asam amino yang bersifat polar yaitu : Glu 241 dan Asp 41. Untuk memperkuat data ini perlu dilakukan penentuan struktur dan urutan residu asam amino dari umbi dahlia ini.

Jumlah endapan ekstrak enzim pada fraksi II untuk ketiga pengeksrak lebih sedikit dibandingkan fraksi I, hal ini disebabkan sebagian besar protein atau enzim inulinase sudah diendapkan pada fraksi I. Dan aktivitas ekstrak inulinase juga menurun pada fraksi II.

## **BAB VI**

### **KESIMPULAN DAN SARAN**

#### **6.1. Kesimpulan**

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa aktivitas ekstrak inulinase tertinggi untuk fraksi I dan II adalah inulinase yang diekstrak dengan etanol, dan yang terendah adalah inulinase yang diekstrak dengan aseton. Berdasarkan aktivitas ekstrak inulinase pada fraksi I dan II maka larutan pengekstrak yang lebih efektif digunakan adalah etanol.

#### **6. 2. Saran**

Berdasarkan hasil penelitian ,maka dapat disarankan :

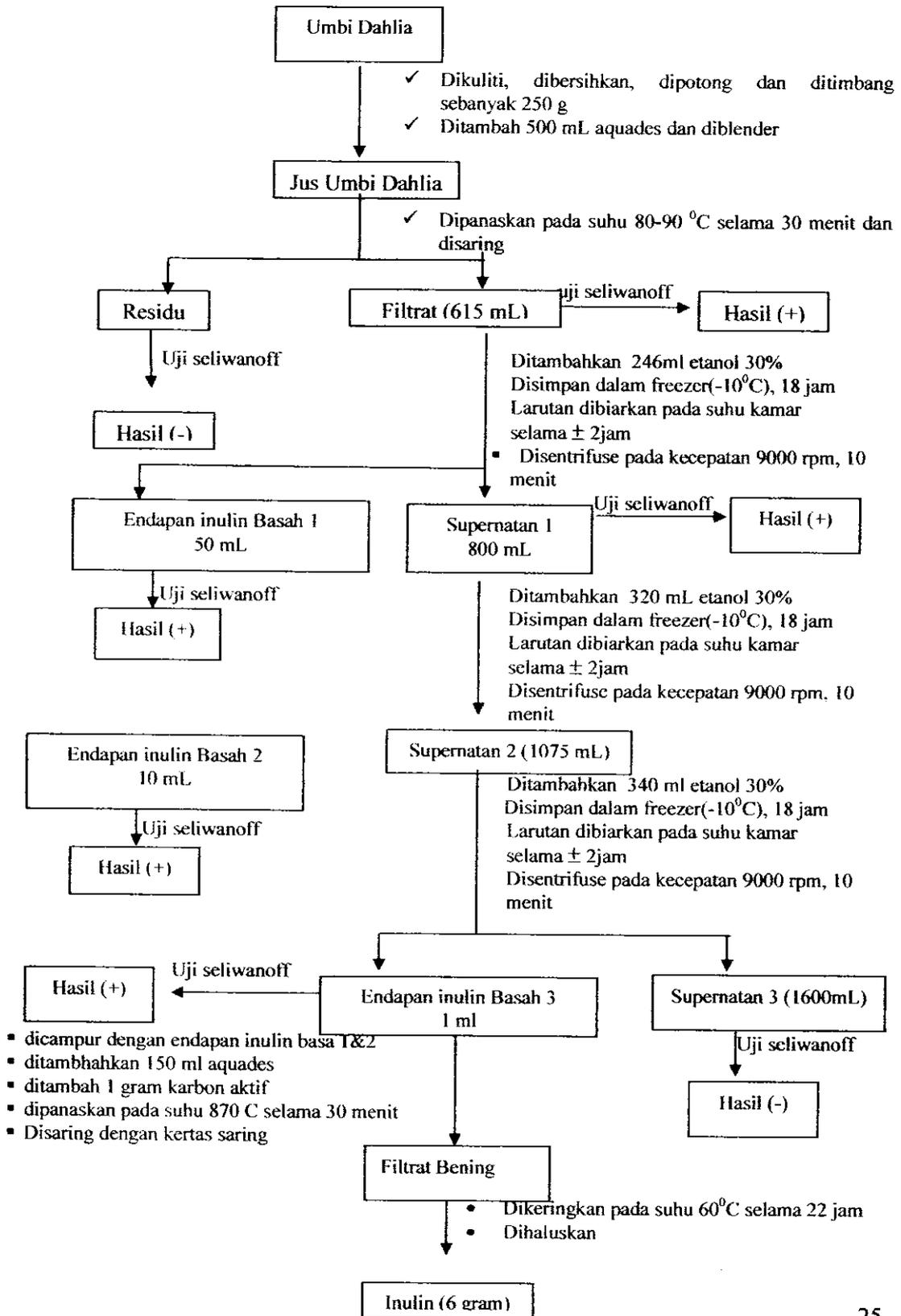
1. Pengekstrak yang efektif digunakan untuk mengekstrak inulinase dari umbi dahlia adalah etanol
2. Perlu dilakukan penelitian tentang pemurnian dan penentuan struktur dan urutan residu asam amino inulinase untuk memperkuat hasil penelitian di atas dan untuk memperoleh aktivitas inulinase yang lebih tinggi..

## DAFTAR PUSTAKA

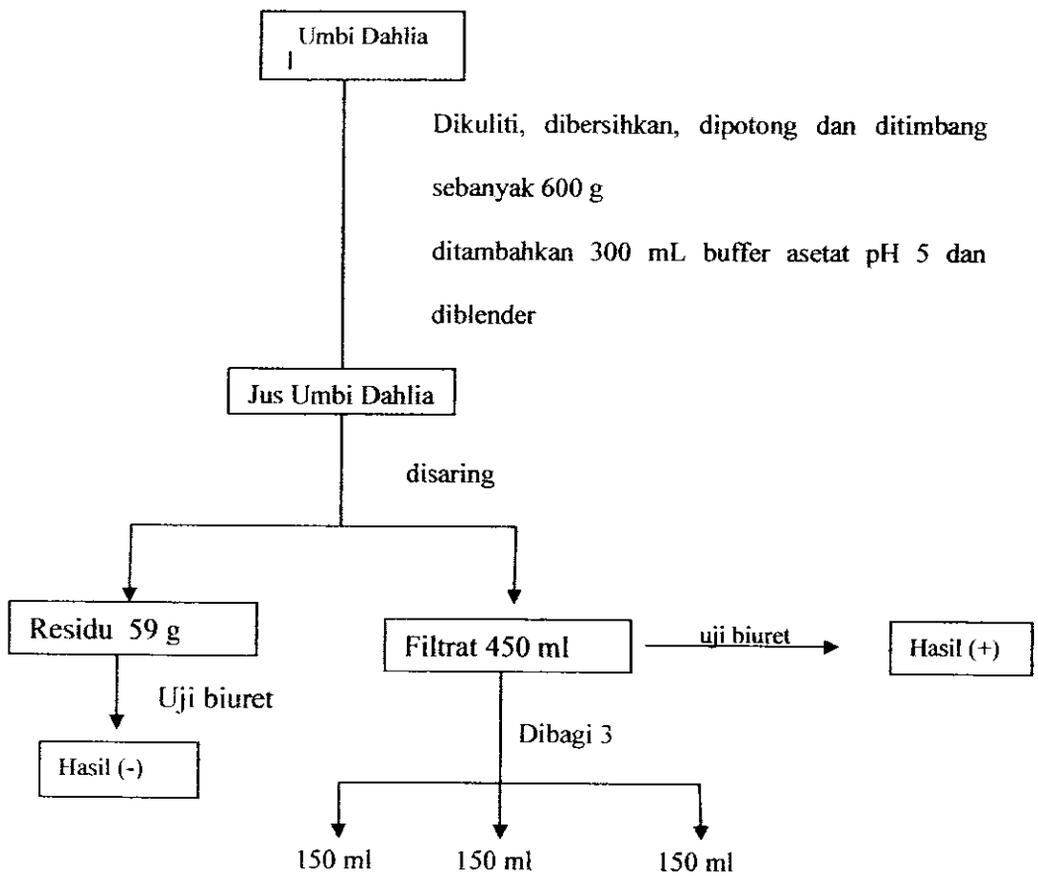
- Admin, (2003). *Dahlia cantik bunganya manis umbinya*. Halal MUI
- Alexander, R.R; Griffiths, J.M.(1993). *Basic Biochemiscal Method*. New York: John Wiley & Sons.
- Andyani, NF (2001). *Produksi Sirup Fruktosa dari Inulin Dahlia Pinata Cav secara Hidrolisis Asam*. Skripsi. Fakultas Teknologi Pangan IPB. Bogor
- Bergner, P.(2004). "Inulin". <http://www.medherb.com>. Diakses 5 April 2004
- Clark ,J. M & Switzer,R.L, (1977) *Experimental Biochemistry*, second edition, San Francisco: WH Freeman and Company.p.75
- Colowick, S.P; Kaplan, N.O(1955). *Methods in Enzymology*. New York: Academic Press Inc
- Deutscher, Murray (1990). *Guide to Protein Purification*. San Diego; Academic press.
- De Souza Motta, et al. (2005). *Aspergillus neveux Blochwitz 4128 UKM: New Source for inulinase product*. Brazilian Archives of Biology and Technology
- Ertan, F. (2003). Determination of Optimum Cultivation Condition on the Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. *Pakistan Journal of Sciences* 6(16):1386-88
- Fitriani (1999). Studi Pendahuluan Hidrolisa Inulin dari Umbi Dahlia. *Skripsi*. Fakultas Teknik Kimia. Universitas Bung Hatta. Padang
- Frack, A; Leenheer,L.D.(2003). Inulin. Email [ann.franck@orafti.com](mailto:ann.franck@orafti.com). Diakses 25 Maret 2004
- Gauda, M.K. (2002). Some properties of inulinase from *Aspergillus fumigatus*. *Pakistan Journal of Biological Science* 5(5). p.589
- Heinicke, R.M and Gortner, W.A. (1957). Stem Bromelain a New Protease Preparation from Pineapple Plants. pp. 225-23; 23
- Nagem, R.A.P; Rojas, A.L; Golubev, A.M; Korneeva, O.S. (2004). Crystal structure of exo-inulinase from *Aspergillus awamori*: the enzyme fold and structural determinant of substrate recognition. *J.Mol.Biol.* Vol.344 pp.471.
- Niness, K.R. (1999). "Inulin and oligofruktosa : what are they". *Journal of Nutrition*. 1999;129:1402S-1406S. <http://www.nutrition.org>. Diakses tanggal 4 April 2004

- Pessoa, and Vitolo (1999). Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction. *J.Chem Eng.* Vol.16. No 3
- Plummer, DT.(1978). *Introduction to Practical Biochemistry*. Second edition. New Delhi: Mc. Graw Hill Publishing Company
- Rukmana, R (2005). *Dahlia Prospek Agribisnis dan Teknik Budi Daya*. Yogyakarta: Kanisius.
- Rulis, A.M. (2003). *Center for food safety and applied nutrition office of food additive safety*. Diakses 3 April 2004.
- Sari, D.U. (1991). *Penentuan aktivitas enzim bromelain dari buah, batang dan tangkai nenas dengan metoda Anson*. Tesis. Padang : Unand. hal.7:9-10
- Scopes, R.K. (1987). *Protein Purification Principles and Practice*. Second edition New York: Springer-Verlag.
- Souza-Motta, C.M; Cavaicanti, M.A.Q; Porto, A.L.F; Moreira, K.A; Filho, J.L.L. (2005). *Aspergillus niveus* Blochwitz 4128URM: new source for inulinase production. *Braz arc.biol.technol.* Vol.48. No 3
- Vranesic, D; Kurtanjek. Z; Santos A.M.P; Maugeri, F.(2001). Optimization of Inulinase Production by *Kluyveromyces bulgaricus*. *Food Technol. Biotechnol.* 40(2002)
- Walpole, R.E; Myers, R.I(1995). *Ilmu peluang dan Statistika untuk Insinyur dan Ilmuwan*. Edisi ke-4. Bandung; penerbit ITB.
- Whiteley, C. (2003). *Chicory*. Rhodes University.
- Wijaya, S.K.S.(2002). Isolasi Kitinase dari *Scleroderma columnare* dan *Trichoderma harzianum*. *Jurnal Ilmu Dasar*. Vol .3. No 1.

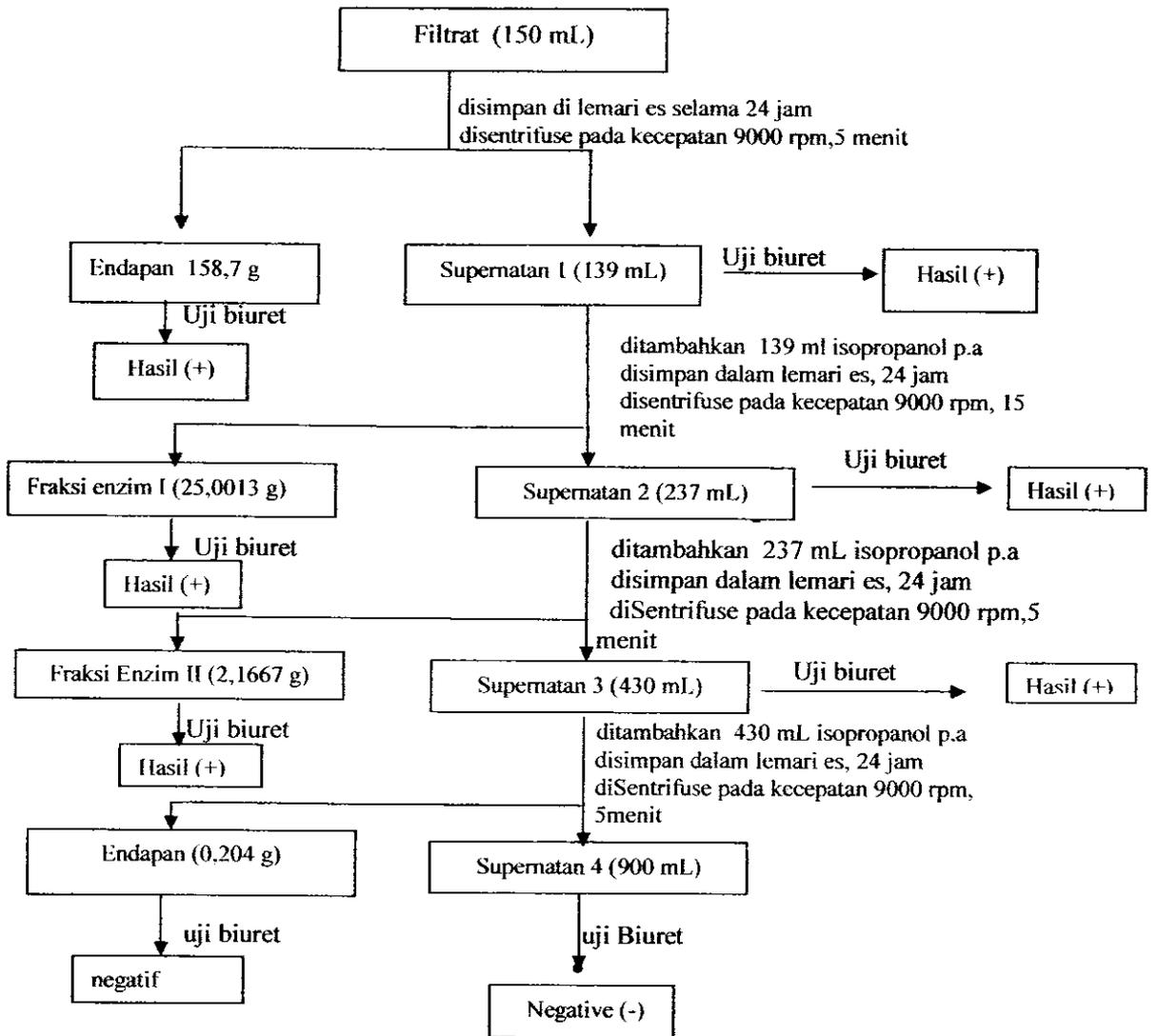
**Lampiran.1. Skema Kerja Ekstraksi Inulin**



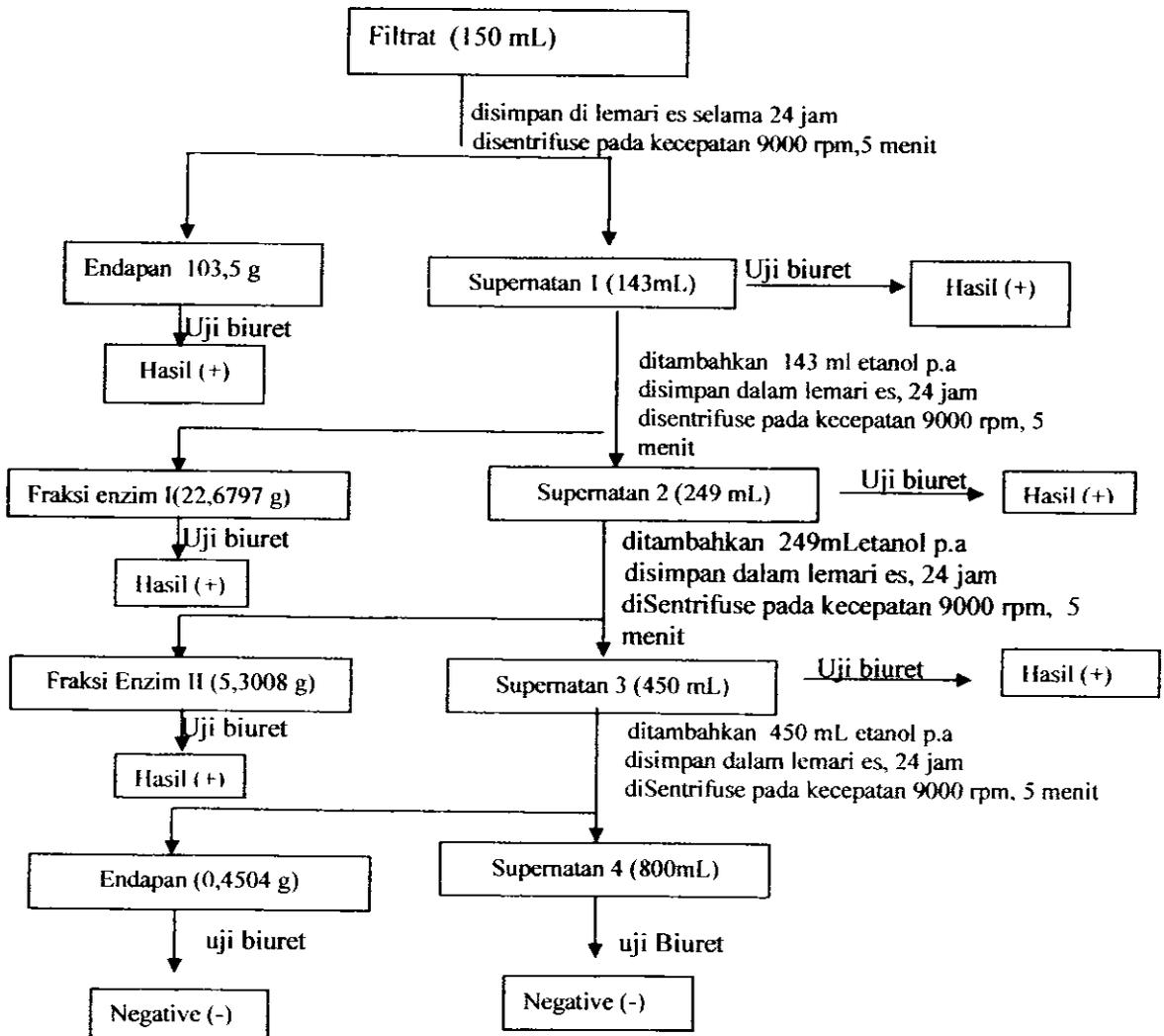
## Lampiran.2. Skema Kerja Pembuatan Jus Umbi Dahlia



**Lampiran.3. Skema Kerja Ekstraksi Inulinase dengan isopropanol**

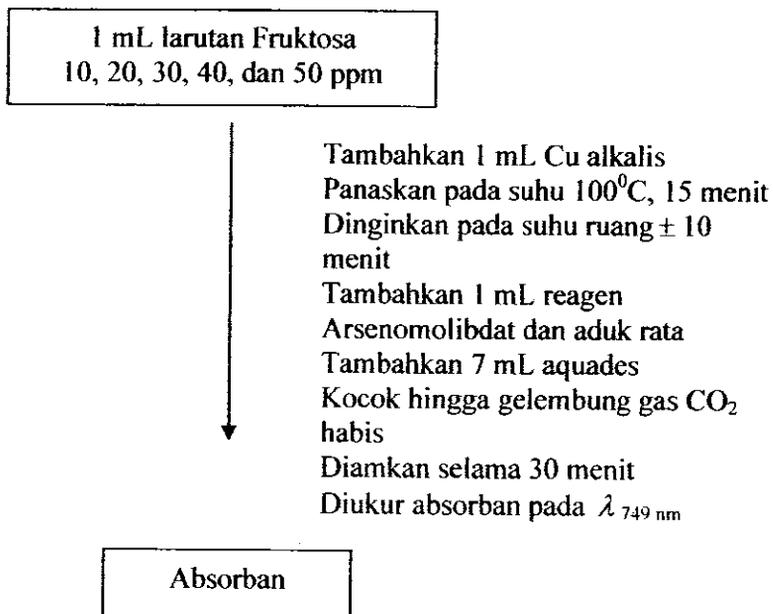


**Lampiran.4. Skema Kerja Ekstraksi Inulinase Dengan Etanol**



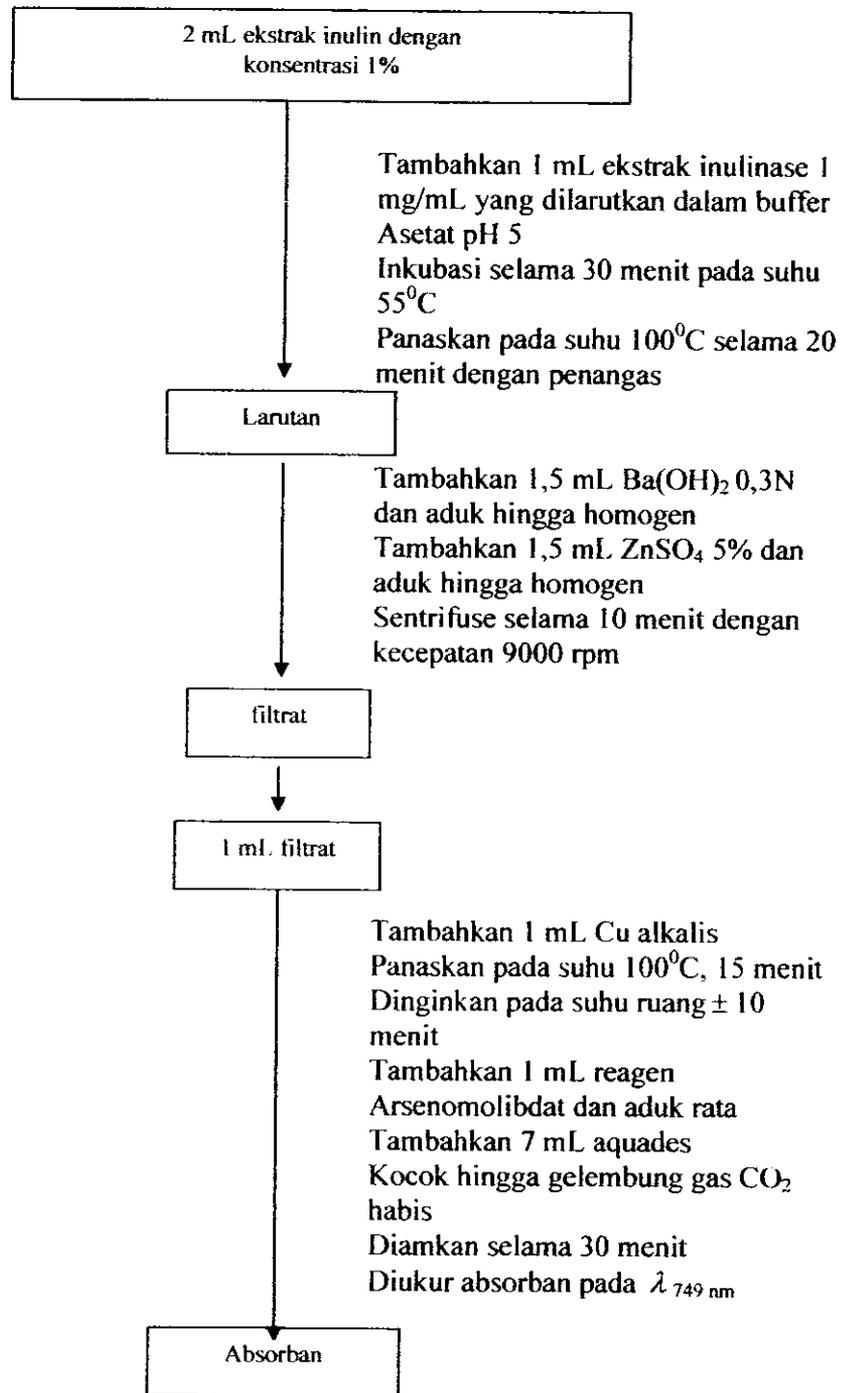
### Lampiran.7. Skema Kerja Penentuan Serapan Larutan Standar Fruktosa

Penentuan Serapan Larutan Standar Fruktosa ( Penentuan Kurva Standar Fruktosa)



Blanko : Aquades sebagai pengganti sampel yang diperlakukan sama

### Lampiran.8. Skema Kerja Penentuan Aktivitas Inulinase



Blanko : Aquades sebagai pengganti sampel yang diperlakukan sama

Kontrol : Inulin tanpa enzim yang diperlakukan sama

**Lampiran.7. Data Dan Perhitungan Regresi Linier Larutan Standar Fruktosa**

X	Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>	X. Y
10	0,12960	100	0,01679	1,2960
20	0,25449	400	0,06476	2,5449
30	0,39384	900	0,15511	3,9384
40	0,61522	1600	0,37849	6,1522
50	0,84114	2500	0,74156	8,4114
Σ= 150	Σ= 2,25429	Σ= 5500	Σ= 1,35671	Σ= 85,8668

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - (\sum x)(\sum y)}{\sqrt{(n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2) (n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2)}}$$

r = 0,988597                      α = - 0,096343

β = 0,0182381

**Lampiran 8. Contoh perhitungan penentuan aktivitas enzim inulinase**

$$\text{Aktivitas ekstrak inulinase} = \frac{X}{\text{Mr Fruktosa}} \times \frac{l}{t}$$

Konsentrasi Fruktosa (X) = 25,8712 μg/ml

t = 30 menit      Mr fruktosa = 180,162

$$\begin{aligned} \text{Aktivitas ekstrak inulinase} &= \frac{25,8712 \mu\text{g/ml}}{180,162 \text{ g/mol}} \times \frac{l}{30} \\ &= 4,78 \cdot 10^{-3} \text{ unit/mL} \end{aligned}$$