

**PENENTUAN AKTIVITAS DAN TIPE AKSI ENZIM
INULINASE DARI BAKTERI RIZOSFER
UMBI DAHLIA (*Dahlia sp.*)
ISOLAT A₂-KG**

SKRIPSI

Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Sains



ELSA TRIANDOLA

14036024/2014

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKAN DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2018**

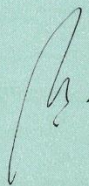
PERSETUJUAN SKRIPSI

**PENENTUAN AKTIVITAS DAN TIPE AKSI ENZIM INULINASE DARI
BAKTERI RIZOSFER UMBI DAHLIA (*Dahlia sp.*)**

Nama : Elsa Triandola
Nim : 14036024
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Agustus 2018

Pembimbing I



Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si

NIP. 19641124 199112 2 001

Pembimbing II



Dra. Sri Benti Etika, M.Si

NIP. 19620913 198803 2 002

HALAMAN PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan didepan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Kimia
Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Judul : Penentuan Aktivitas Dan Tipe Aksi Enzim Inulinase Dari
Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia Sp.*) Isolat A₂-KG

Nama : Elsa Triandola

NIM : 14036024

Program Studi : Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Agustus 2018

Tim Penguji

Nama

Tanda Tangan

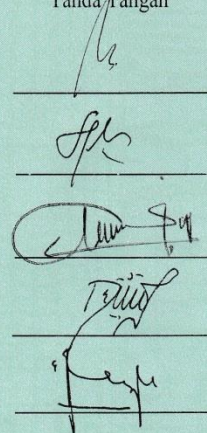
1. Ketua : Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si

2. Sekretaris : Dra. Sri Benti Etika, M.Si

3. Anggota : Ananda Putra, M.Si, Ph.D

4. Anggota : Dr. Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si

5. Anggota : Edi Nasra, S.Si, M.Si



SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Elsa Triandola
TM/NIM : 14036024/2014
Tempat/Tanggal Lahir : Paninggahan/ 23 Februari 1996
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : MIPA
Alamat : Muaro Pingai, Kec. Junjung Sirih, Kab. Solok
No.HP/Telepon : 081270166779
Judul Skripsi : Penentuan Aktivitas dan tipe Aksi Enzim Inulinase dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia Sp.*) Isolat A₂-KG

Dengan ini saya menyatakan bahwa :

1. Karya tulis/skripsi ini adalah hasil dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademi (sarjana) baik di UNP maupun perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis/skripsi ini murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain kecuali arahan tim pembimbing.
3. Pada karya tulis/skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain kecuali tertulis dengan jelas dicantumkan pada daftar pustaka.
4. Karya tulis/skripsi ini sah apabila telah ditandatangan **Asli** oleh tim pembimbing dan tim penguji

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh dan apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran di dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima **Sanksi Akademik** berupa pencabutan gelar akademik yang telah diperoleh karena karya tulis/skripsi ini, serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi..

Padang, Agustus 2018
Yang membuat pernyataan,



Elsa Triandola
NIM : 14036024

ABSTRAK

Elsa Triandola, 2018 : Penentuan Aktivitas dan Tipe Aksi Enzim Inulinase dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia Sp.*) Isolat A₂-KG

Inulinase dari bakteri rizosfer umbi *Dahlia* sp merupakan enzim yang mampu mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS). Fruktosa dan FOS merupakan dua senyawa penting di industri pangan. Enzim inulinase dikategorikan menjadi 2 tipe aksi yaitu endoinulinase dan exoinulinase. Exoinulinase dapat menghasilkan fruktosa dengan memotong ikatan β -2,1 secara berurutan, sedangkan endoinulinase dapat menghasilkan fruktooligosakarida dengan memotong secara acak dan menghidrolisis ikatan internal pada inulin. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas optimum inulinase pada variasi pH (3 ; 3,5; 4; 4,5; 5,5; dan 6), suhu (20°C; 30°C; 37°C; 40°C dan 50°C), dan konsentrasi substrat (1 % ; 1,5% ; 2 % dan 2,5 %) dengan waktu inkubasi 30 menit. Selain itu, juga dilakukan penentuan nilai K_M dan V_{maks} inulinase serta menentukan tipe aksi dengan menggunakan metoda KLT. Aktivitas inulinase yang ditemukan optimum pada pH 4 ; suhu 40°C dan konsentrasi substrat 2 %. Nilai K_M dan V_{maks} inulinase adalah 3,12 % (w/v) dan V_{maks} 0,288 U/mL. Tipe aksi enzim inulinase yang ditemukan pada bakteri rizosfer umbi dahlia yaitu endoinulinase.

Kata kunci : *inulin, inulinase, aktivitas enzim inulinase, dan tipe aksi inulinase dari bakteri.*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Salawat dan salam tidak lupa pula penulis kirimkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umatnya ke zaman yang berilmu pengetahuan seperti sekarang ini.

Skripsi ini berjudul **“Penentuan Aktivitas Dan Tipe Aksi Enzim Inulinase Dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia sp.*) Isolat A₂-KG”** yang diajukan sebagai salah satu syarat memperoleh gelar Sarjana Sains. Dalam menyelesaikan skripsi ini, penulis mendapatkan bantuan, bimbingan, dan arahan dari berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si selaku dosen pembimbing I dan penasehat akademik.
2. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si selaku dosen pembimbing II.
3. Bapak Ananda Putra, M.Si. Ph.D , Ibu Dr. Desy Kurniawati, S.Pd. M.Si dan Bapak Edi Nasra, S.Si. M.Si selaku dosen penguji skripsi
4. Bapak Dr. Mawardi, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang.
5. Bapak Hary Sanjaya, S.Si, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Negeri Padang.
6. Seluruh Staf Pengajar dan Tenaga Administrasi di Jurusan Kimia FMIPA UNP.

7. Penata Labor Pendidikan (PLP) Kimia FMIPA yang telah memberikan bantuan dan dorongan selama penelitian.

Penulisan skripsi ini telah dilakukan sebaik-baiknya, namun untuk kesempurnaan skripsi ini, diharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Atas kritik dan saran penulis mengucapkan terima kasih.

Padang, Agustus 2018

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR.....	ii
DAFTAR ISI.....	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
DAFTAR SINGKATAN.....	ix
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1. Latar Belakang.....	1
1.2. Rumusan Masalah.....	3
1.3. Batasan Masalah	3
1.4. Tujuan Penelitian	4
1.5. Manfaat penelitian	4
BAB II TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1. Inulin.....	5
2.2. Bakteri Pendegradasi Inulin.....	6
2.3. Enzim Inulinase	7
2.4. Aktivitas Enzim Inulinase.....	8
2.5. DNS (Dinitrosalisilat).....	9
2.6. Tipe Aksi Enzim Inulinase	11
2.7. Kromatografi Lapis Tipis	12
2.8. Spektrofotometri UV-Vis	14
BAB III METODA PENELITIAN.....	16
3.1. Waktu dan Tempat Penelitian.....	16
3.2. Variabel Penelitian.....	16

3.3. Objek Penelitian.....	16
3.4. Alat dan Bahan	17
3.5. Prosedur Penelitian	17
3.5 Desain Penelitian	20
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fruktosa	21
4.2. Aktivitas Inulinase	22
4.3. Tipe Aksi Inulinase.....	29
BAB V PENUTUP	32
5.1. Kesimpulan.....	32
5.2. Saran	32
DAFTAR PUSTAKA.....	33
LAMPIRAN.....	36

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
4.1. Aktivitas Inulinase pada Variasi pH	23
4.2. Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu	24
4.3. Aktivitas Inulinase pada Variasi Konsentrasi Substrat	26
4.4. Kebalikan Berganda Konsentrasi Substrat Dan Laju Katalisis Enzim	28

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
2.1. Struktur inulin.....	5
2.2. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS	10
2.3. Reaksi pelepasan exo- dan endo-inulinase dari mikromolekul	11
2.4. Hasil penentuan produk hidrolisis inulinase dari <i>P.Spinulosum</i> (KLT) dengan tipe exoinulinase.....	13
2.5. Hasil penentuan produk hidrolisis inulinase dari <i>T.viride</i> (KLT) dengan tipe endoinulinase	13
4.6. Kurva Kalibrasi Larutan Standar Fruktosa	21
4.7. Kurva Aktivitas Inulinase pada Variasi pH	23
4.8. Kurva Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu.....	25
4.10. Kurva Lineweaver-Burk yang menggambarkan Harga K_M dan V_{maks} dari isolat A_2 -KG	28
4.11. Penentuan produk hidrolisis inulin menggunakan TLC. 1: inulin (sebagai standar), 2: glukosa (sebagai standar), 3: fruktosa (sebagai standar), 4: hidrolisis 1 jam, 5: hidrolisis 12 jam, 6: hidrolisis 24 jam.	30

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Pembuatan Media padat.....	36
2. Pembuatan Media Cair	37
3. Ekstraksi Crude Enzim	38
4. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fruktosa	39
5. Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi pH	40
6. Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu	41
7. Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Konsentrasi Substrat	42
8. Penentuan Tipe Aksi Inulinase	43
9. Hasil Penelitian	44
10. Perhitungan	46
11. Dokumentasi Hasil Penelitian	55

DAFTAR SINGKATAN

DNS	: Dinitrosalicylic Acid
DP	: Derajat Polimerisasi
FOS	: Fruktooligosakarida
KLT	: Kromatografi Lapis Tipis
R _f	: Retention Factor
TLC	: Thin Layer Chromatography
UV-Vis	: Ultraviolet Visibel

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Perkembangan enzim di bidang industri sangat pesat, salah satunya enzim inulinase. Enzim inulinase merupakan enzim yang terlibat pada reaksi hidolisis inulin yang menghasilkan fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS) (Baston dan Barma, 2013). Fruktosa merupakan gula pereduksi yang tingkat kemanisannya 1,7 lebih manis dibandingkan dengan sukrosa. Fruktosa digunakan sebagai pengganti sukrosa dan FOS umumnya digunakan sebagai prebiotik.

Enzim inulinase dapat dihasilkan dari bakteri, jamur, maupun tumbuhan. Enzim inulinase dapat ditemukan pada rizosfer umbi dahlia. Rizosfer umbi dahlia merupakan tanah yang melekat pada sekitar permukaan akar umbi dahlia yang berfungsi sebagai perantara mikroorganisme dengan pusat nutrisi dari tumbuhan. Tumbuhan tersebut dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri pendegradasi inulin. Beberapa bakteri pendegradasi inulin adalah *Bacillus sp*, *Candida sp*, *Marinimicrobium sp*, *Nocardiopsis sp*, *Sphingobacterium sp*, *Clostridium sp* dan *Geobacillus sp* (Singh *et al.*, 2016).

Umbi dahlia merupakan bagian dari tanaman dahlia. Tanaman ini dapat ditemukan di Indonesia yaitu di daerah dataran tinggi seperti dataran tinggi Jawa Barat dan Sumatra Barat. Umbi dahlia dapat menghasilkan inulin dengan jumlah yang besar. Inulin juga dapat dihasilkan dari *jerusalem artichoke*, chicory, bawang putih, salisfy, dendelion, bawang merah, bawang putih, pisang, gandum, gandum hitam (Mensink *et al*, 2015). Inulin merupakan polimer alami kelompok karbohidrat dengan monomer fruktosa. Antara monomer fruktosa pada inulin

dihubungkan oleh ikatan (2→1) residu β -D-fructofuranosyl. Tiap ujung pereduksi untai polimer inulin dapat hadir glukosa (Azhar, 2009).

Aktivitas enzim inulinase berhubungan dengan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan yaitu semakin tinggi aktivitas inulinase maka semakin banyak pula gula pereduksi yang dihasilkan. Jumlah gula pereduksi yang dihasilkan berkaitan dengan nilai absorbansi yang diperoleh pada penentuan aktivitas inulinase. Penentuan aktivitas inulinase dapat dilakukan menggunakan pereaksi asam dinitro salisilat/ *dinitrosalicylic acid* (DNS), absorbansi diukur pada panjang gelombang 540 nm (Miller GL, 1959).

Aktivitas enzim dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah pH, suhu dan substrat. Enzim akan aktif pada pH, suhu tertentu, dengan konsentrasi substrat. Inulinase dapat aktif secara optimum pada suhu yang bervariasi tergantung asal inulinase tersebut. Berdasarkan penelitian sebelumnya, enzim inulinase aktif pada suasana asam lemah berkisaran dari 4,5-6. Aktivitas optimum inulinase ekstraseluler yang diproduksi dari bakteri *Bacillus sp.* memiliki pH 8 dengan suhu 50°C (Aruna, 2014). Aktivitas inulinase dari *Bacillus sp.* pada pH 4,5 dan suhu 60°C (Zhou *et al*, 2016). Sedangkan, aktivitas dari *Aspergillus sp.* memiliki pH 5 dengan suhu 45°C-55°C (Trytek, *et al*, 2015).

Enzim inulinase dikategorikan menjadi 2 tipe aksi yaitu endoinulinase dan exoinulinase. Exoinulinase dapat menghasilkan fruktosa dengan memotong ikatan β -2,1 secara berurutan, sedangkan endoinulinase dapat menghasilkan fruktooligosakarida dengan memotong secara acak dan menghidrolisis ikatan internal pada inulin (Magunwidjaja dkk., 2014). Tipe aksi eksoinulinase dan endo

inulinase dapat ditentukan dengan metoda Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Metoda ini dianalisa secara kualitatif dari hasil hidrolisis inulin (Singh *et al.*, 2010).

Kromatografi lapis tipis dapat memisahkan senyawa organik seperti karbohidrat, asam amino, peptida, protein, lipid, steroid, karotenoid, kuinon sederhana (Bintang, 2010). Penentuan tipe aksi inulinase menggunakan KLT telah dilakukan oleh beberapa peneliti seperti Ertan *et al* (2005), Goosen *et al* (2008), Skowronek dan Fiedurek (2005). KLT memiliki kelebihan seperti peralatannya yang lebih sederhana dan biayanya lebih murah. Tipe aksi inulinase dapat diketahui dengan membandingkan Rf (*Retardation factor*) produk hidrolisis inulin dengan standar yang disediakan. Oleh sebab itu penulis tertarik menentukan aktivitas dan tipe aksi enzim inulinase dari bakteri rizosfer umbi dahlia yang ada di Sumatra Barat. Berdasarkan penjelasan di atas penulis tertarik melakukan penelitian yang berjudul **“Penentuan Aktivitas dan Tipe Aksi Enzim Inulinase dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia sp.*) Isolat A₂-KG”**.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan diatas, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu bagaimana aktivitas dan tipe aksi enzim inulinase dari bakteri rizosfer umbi dahlia (*Dahlia sp.*)?

1.3. Batasan Masalah

Aktivitas inulinase dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu pH, suhu dan konsentrasi substrat serta waktu inkubasi. Penelitian ini dibatasi pada hal berikut :

- a. Variasi suhu yang digunakan adalah 20°C; 30°C; 37°C; 40°C dan 50°C.

- b. Variasi pH larutan buffer yang digunakan adalah 3,5 ; 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6.
- c. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 1%; 1,25%; 1,5%; 1,75%; 2% dan 2,25%.
- d. Waktu inkubasi yang digunakan adalah 30 menit.

1.4. Tujuan Penelitian

- 1) Menentukan aktivitas optimum inulinase pada variasi pH, suhu dan konsentrasi substrat pada enzim inulinase dari bakteri rizosfer umbi dahlia.
- 2) Menentukan nilai K_M dan V_{maks} inulinase.
- 3) Menentukan tipe aksi enzim inulinase.

1.5. Manfaat penelitian

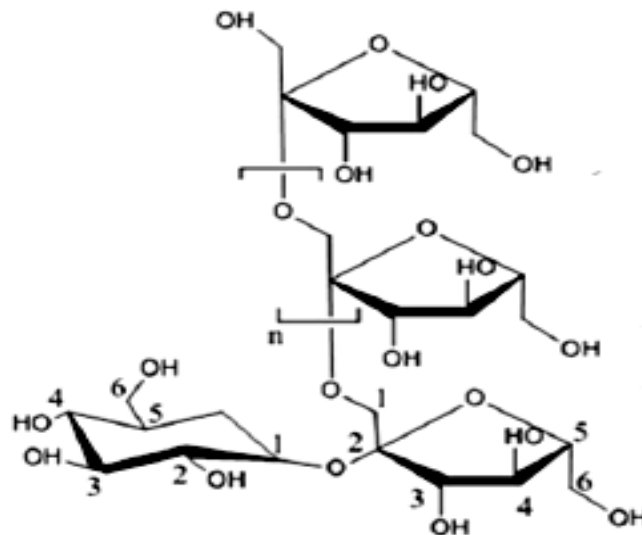
- 1) Memperoleh bakteri pendegradasi inulin dari bakteri rizosfer umbi dahlia
- 2) Memberikan informasi tentang aktivitas dan tipe aksi enzim inulinase dari bakteri rizosfer umbi dahlia.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Inulin

Inulin merupakan polimer alami kelompok karbohidrat dengan monomer fruktosa. Antara monomer fruktosa pada inulin dihubungkan oleh ikatan (2→1) residu β -D-fructofuranosyl. Tiap ujung pereduksi untai polimer inulin dapat hadir glukosa (Azhar, 2009). Struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 2.1:



Gambar 2.1. Struktur inulin (Jiang et al., 2017)

Polimer inulin dapat ditulis GF_n yaitu fruktan dengan ujung terminal glukosa atau F_n yaitu fruktan tanpa ujung terminal glukosa. G merupakan unit glukosa terminal, F adalah unit fruktosa, n merupakan jumlah unit fruktosa atau derajat polimerisasi (DP). Oligofruktosa mempunyai DP 3–10. DP inulin bervariasi tergantung sumbernya. Hidrolisis sempurna inulin menghasilkan banyak fruktosa dan sedikit glukosa, jika diartikan tiap ujung molekul inulin

terikat satu residu glukosa. Inulin yang berasal dari tumbuh-tumbuhan merupakan molekul linear dengan DP yang bervariasi dari beberapa unit fruktosa sampai sekitar 70. Oleh karena itu, inulin adalah campuran dari polimer dan oligomer.

Inulin terdapat pada tanaman dan sayuran. Tanaman yang banyak mengandung inulin yaitu *jerusalem artichoke*, chicory, dan dahlia. Inulin juga terdapat pada bawang putih, asparagus, salisfy dan dendelion. Sayuran yang mengandung inulin yaitu bawang merah, bawang putih, pisang, gandum, gandum hitam (Mensink *et al*, 2015). Inulin berbentuk serbuk putih, bersifat amorf, tidak berbau dan hidroskopik. Inulin tidak larut dalam air, tetapi larut dalam air panas (Azhar, 2009).

2.2. Bakteri Pendegradasi Inulin

Bakteri merupakan mikroorganisme bersel satu (prokariotik) yang dapat ditemukan di lingkungan seperti tanah, udara, debu, air, serta dapat hidup pada tubuh hewan, tumbuhan dan manusia. Sebagian prokariot dapat hidup di lingkungan ekstrim seperti kadar asam yang tinggi, kadar garam yang tinggi, dan temperatur yang tinggi. Kelompok prokariot ini disebut dengan *archaea* (Khiyami, 2012).

Bakteri dapat dikelompokkan menjadi beberapa kelompok berdasarkan suhu optimum tumbuhnya yaitu psikrofil, mesofil, termofil, dan hipertermofil. Bakteri psikrofil merupakan bakteri yang dapat hidup pada suhu rendah yaitu sekitar 0-20°C. Bakteri mesofil merupakan bakteri yang dapat hidup pada suhu 20-45°C. Bakteri termofilik dapat hidup pada suhu 45-65°C. Bakteri hipotermofilik dapat

hidup pada suhu diatas 90°C dan maksimal pada suhu 100°C, namun ada pula beberapa bakteri dapat hidup pada suhu 80-113°C (Prescott, 2005).

Kelompok bakteri mesofil dan termofil dapat ditemukan pada rizosfer umbi dahlia. Rizosfer umbi dahlia merupakan tanah yang melekat pada sekitar permukaan akar umbi dahlia yang berfungsi sebagai perantara mikroorganisme dengan pusat nutrisi dari tumbuhan. Tumbuhan tersebut dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri pendegradasi inulin. Beberapa bakteri pendegradasi inulin adalah *Bacillus sp*, *Candida sp*, *Marinimicrobium sp*, *Nocardiopsis sp*, *Sphingobacterium sp*, *Clostridium sp* dan *Geobacillus sp* (Singh *et al.*, 2016).

Umbi dahlia merupakan bagian dari tanaman dahlia. Tanaman ini dapat ditemukan di Indonesia yaitu di daerah dataran tinggi seperti dataran tinggi di pulau Jawa dan Sumatra. Di pulau Jawa tanaman dahlia dapat ditemukan di daerah dataran tinggi Jawa Barat, sedangkan di pulau Sumatra tanaman dahlia dapat ditemukan di daerah dataran tinggi Sumatra Barat (Azhar, 2009). Umbi dahlia dapat menghasilkan inulin dengan jumlah yang besar.

2.3. Enzim Inulinase

Enzim inulinase merupakan biokatalis pada reaksi hidrolisis inulin menghasilkan FOS (fructooligosakarida) dan fruktosa. Enzim ini bisa dihasilkan oleh bakteri, jamur, maupun tumbuhan. Enzim inulinase juga diproduksi bakteri yang diisolasi dari umbi dahlia. Enzim inulinase pertama kali diisolasi dari tanaman yang mengandung inulin yaitu dari familia Composita.

Enzim inulinase dapat berasal dari golongan jamur *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Chrysosporium sp*, Khamir (yeast) *Kluyveromyces sp*, *Candida sp*,

Debaromyces dan *Saccharomyces* sp dari golongan bakteri *Arthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp dan *Bacillus* sp (Wijanarka, 2002). Mikroorganisme ini menghasilkan enzim intraseluler dan enzim ekstraseluler.

Enzim intraseluler merupakan enzim yang langsung digunakan di dalam sel, dan sering ditemukan pada bagian membran dari sebuah organel sel. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang dilepas dari sel ke lingkungan luar sel untuk menghidrolisis molekul polimer di lingkungan, seperti selulosa, hemiselulosa, lignin, ataupun juga untuk memfasilitasi pengambilan suatu zat dari lingkungan bagi kebutuhan metabolismenya. Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan luar sel dengan filtrasi ataupun sentrifugasi, sedangkan enzim intraseluler dapat diekstrak dari dalam sel lewat proses pemecahan sel (Lehninger, 2004).

2.4. Aktivitas Enzim Inulinase

Aktivitas inulinase didefinisikan sebagai jumlah inulinase yang dapat mengkatalisis pembentukan satu μmol fruktosa pada kondisi reaksi tertentu. Aktivitas spesifik inulinase merupakan jumlah unit yang menunjukkan jumlah μmol produk yang dihasilkan oleh setiap μg protein enzim per menit. Aktivitas spesifik adalah ukuran kemurnian enzim, nilainya naik selama pemurnian suatu enzim, menjadi maksimum dan konstan jika ada pada keadaan murni (Lehninger, 2004).

Aktivitas optimum inulinase dapat ditentukan dengan pH, suhu, waktu inkubasi dan konsentrasi substrat. Aktivitas ini bervariasi tergantung sumber inulinasenya. Aktivitas optimum inulinase dari *Scopulariopsis* sp-CBS pada suhu

45°C; pH 5, dengan waktu inkubasi 5 hari (Susilowati, 2015). Aktivitas optimum inulinase ekstraseluler yang diproduksi dari bakteri *Bacillus sp.* memiliki pH 8 dengan suhu 50°C (Aruna, 2014). Aktivitas inulinase dari *Bacillus sp.* pada pH 4,5 dan suhu 60°C (Zhou *et al.*, 2016). Sedangkan, aktivitas dari *Aspergillus sp.* memiliki pH 5 dengan suhu 45°C-55°C (Trytek, *et al.*, 2015). Aktivitas enzim inulinase dapat ditentukan dengan rumus dibawah ini :

$$\text{Aktivitas enzim} = \frac{[X]}{\text{Mr fruktosa} \cdot t} \text{ Unit / mL}$$

Keterangan :

[X] = jumlah gula pereduksi (µg/mL)

t = waktu inkubasi (menit)

Mr Fruktosa = 180,1

2.5. DNS (Dinitrosalisilat)

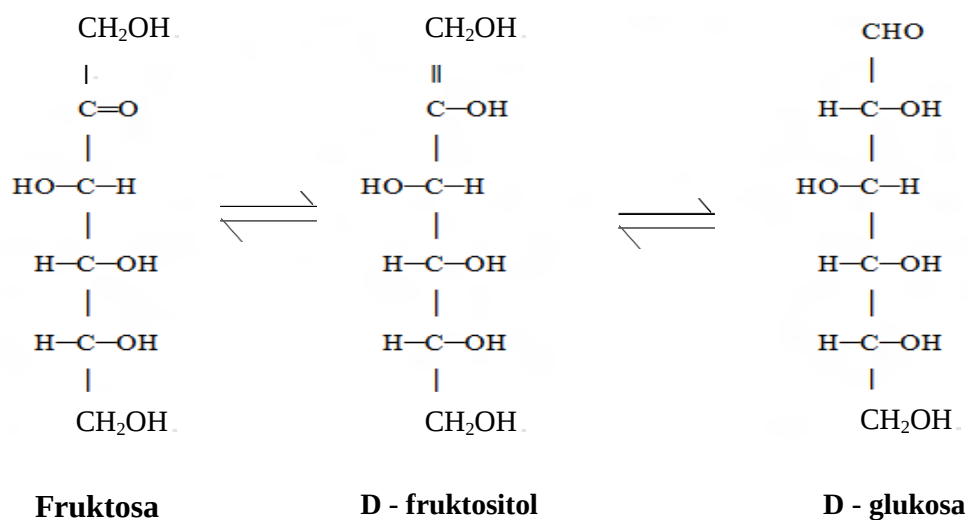
DNS adalah asam dinitro salisilat. DNS merupakan salah satu senyawa aromatis yang jika bereaksi dengan gula pereduksi akan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Senyawa ini dapat menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 550 nm.

Metode analisis dengan reagen DNS digunakan untuk mengetahui seberapa besar kadar gula pereduksi yang terdapat dalam sampel. Metode ini juga banyak digunakan untuk menentukan kadar gula pereduksi. Reagen DNS dapat dibuat dengan melarutkan asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH, Na₂SO₃, Na-K-tartarat, fenol, dan aquades. DNS memiliki pH basa sehingga fruktosa mudah untuk teroksidasi

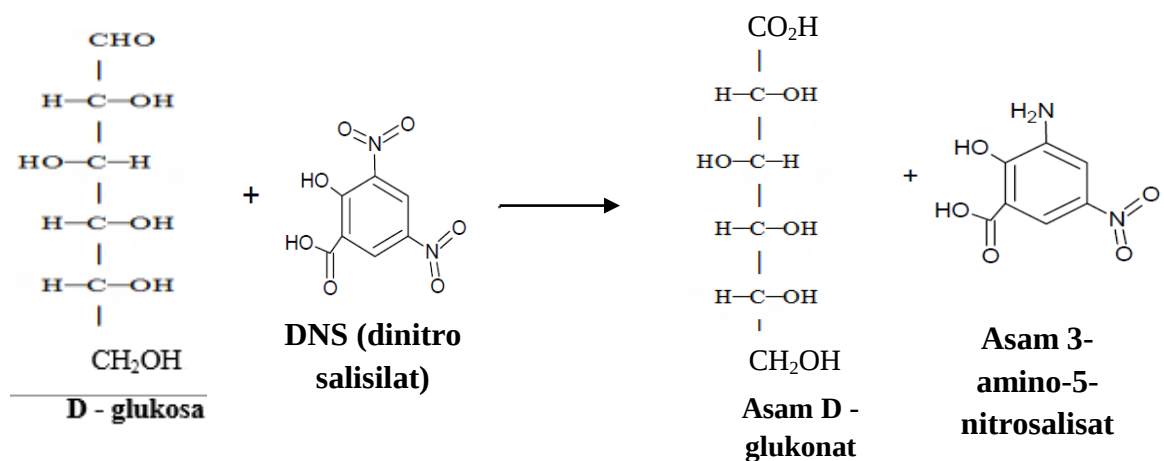
karena berada pada kesetimbangan dengan dua aldehida diastereometrik serta penggunaan suatu zat antara tautomerik enadiol (Fessenden, 1982).

Reagen DNS dapat bereaksi dengan produk hidrolisis inulin, reaksinya dapat dilihat pada Gambar 2.2:

Tahap I tautomerik



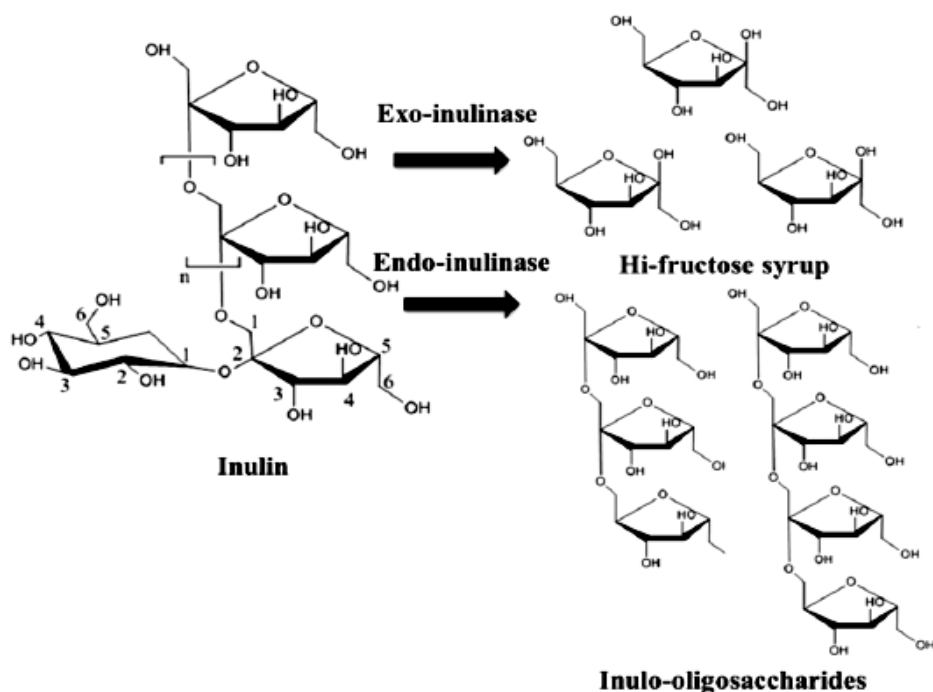
Tahap II reaksi D-glukosa dengan DNS (Dinitro Salisilat)



Gambar 2.2. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS (Miloski, *et al.* 2008)

2.6. Tipe Aksi Enzim Inulinase

Inulinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis inulin menjadi bentuk oligosakarida melalui aktivitas endo-inulinase, dan menjadi monomer fruktosa melalui aktivitas exo-inulinase. Exo-inulinase dapat menghasilkan fruktosa dengan cara memotong ikatan β -2,1 secara berurutan. Endo-inulinase dapat menghasilkan fruktooligosakarida dengan cara memotong secara acak dan menghidrolisis ikatan internal pada inulin. Secara umum, inulinase dari fungi memiliki pola aksi exo, namun pada *Aspergillus niger* ditemukan hanya dapat memproduksi endoinulinase ekstraseluler kecuali pada *A.niger* galur 12 yang dapat memproduksi baik ekso- maupun endo-inulinase. Gambaran dari pemutusan ikatan pada inulin oleh inulinase pada Gambar 2.3.



Gambar 2.3. Reaksi pelepasan exo- dan endo-inulinase dari mikromolekul (Jiang *et al.*, 2017)

2.7. Kromatografi Lapis Tipis

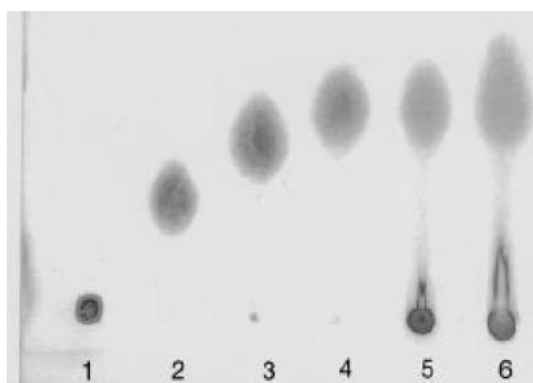
Tipe aksi enzim inulinase dapat ditentukan dengan menggunakan teknik kromatografi lapis tipis (KLT). Kromatografi lapis tipis merupakan kromatografi yang menggunakan lempeng atau aluminium yang dilapisi dengan lapisan tipis alumina, silika gel, dan bahan serbuk lainnya. Prinsip kerja dari kromatografi lapis tipis adalah pemisahan suatu komponen atau campuran berdasarkan kepolaran fasa diam dan fasa geraknya.

Fasa diam dari KLT disebut juga dengan adsorben. Adsorben yang berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-30 μm . Semakin kecil ukuran partikel fasa diam, maka semakin baik kinerja KLT. Adsorben yang paling sering digunakan adalah silika. Umumnya digunakan silika gel 60 F254. Fasa gerak yang digunakan dalam bentuk campuran asam asetat, kloroform, dan air (35; 30; 5 v/v/v). Marker yang digunakan adalah fruktosa sebagai pembanding terhadap sampel yang akan dianalisa dengan KLT. KLT biasanya digunakan pada analisis kualitatif untuk mengukur kepekatan warna noda. KLT juga dapat digunakan untuk menentukan jumlah komponen dalam campuran, mengidentifikasi senyawa, dan memurnikan senyawa. KLT merupakan teknik yang sensitif karena sampel yang digunakan dalam jumlah sangat sedikit dalam satuan mikrogram (μg). Secara umum cara kerja KLT terdiri dari tiga langkah yaitu menotolkan noda, menunggu terjadinya pemisahan komponen, dan menghitung nilai R_f (Retention Factor) yang didapatkan menggunakan rumus :

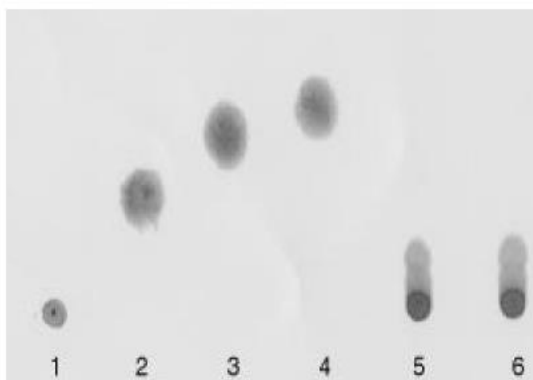
$$R_f = \frac{\text{Jarak Perpindahan Komponen}}{\text{Jarak Perpindahan Pelarut}}$$

(Khopkar, 2008).

Pemisahan dilakukan dengan cara mentotolkan noda dengan pipet mikro untuk memindahkan sedikit sampel ke plat KLT. Noda yang telah ditotolkan akan meninggalkan sedikit material. Setelah noda terpisah, maka dilakukan analisa untuk penentuan tipe aksi enzim inulinase. Hasil hidrolisis inulin pada plat KLT pada Gambar 2.4 dan 2.5:



Gambar 2.4. Hasil penentuan produk hidrolisis inulinase dari *P. Spinulosum* (KLT) dengan tipe exoinulinase, 1: inulin, 2: sukrosa, 3: glukosa, 4: fruktosa, 5: hidrolisis 10 menit, 6: hidrolisis 30 menit (Ertan *et al*, 2003).



Gambar 2.5. Hasil penentuan produk hidrolisis inulinase dari *T. viride* (KLT) dengan tipe endoinulinase, 1: inulin, 2: sukrosa, 3: glukosa, 4: fruktosa, 5: hidrolisis 10 menit, 6: hidrolisis 30 menit (Ertan *et al*, 2003).

Pada Gambar 2.4 dan 2.5 dapat dilihat pemisahan komponen diperoleh dengan membandingkan nilai faktor retensi (R_f) produk hasil hidrolisis inulin dengan nilai retensi larutan standar fruktosa 1%. Pada Gambar 2.4, produk

hidrolisis inulinase dari *P.Spinulosum* nilai retensi produk sama dengan nilai retensi fruktosa, maka tipe aksi inulinase dari *P.Spinulosum* adalah exoinulinase. Sedangkan pada Gambar 2.5, produk hidrolisis inulinase dari *T.viride* nilai retensi produknya berbeda dengan fruktosa, maka tipe aksi inulinase dari *T.viride* adalah endoinulinase (Ertan *et al.*,2003).

2.8. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrofotometri UV-Vis adalah pengukuran serapan cahaya oleh suatu sistem kimia pada panjang gelombang tertentu. Sinar ultraviolet (UV) mempunyai panjang gelombang antara 200-400 nm, dan sinar tampak (visible) mempunyai panjang gelombang 400-750 nm. Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu metode analisis yang digunakan untuk menentukan komposisi suatu sampel baik secara kuantitatif dan kualitatif yang didasarkan pada interaksi antara materi dengan cahaya. Peralatan yang digunakan dalam spektrofotometri disebut spektrofotometer. Spektrofotometer salah satu alat yang melibatkan energi elektronik yang cukup besar pada molekul yang dianalisis, sehingga spektrofotometer UV-Vis lebih banyak dipakai untuk analisis kuantitatif dibandingkan kualitatif. Spektrum UV-Vis sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit di dalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada λ tertentu dengan menggunakan hukum Lambert-Beer. Hukum Lambert-Beer menyatakan hubungan linieritas antara absorban dengan konsentrasi larutan analit dan berbanding terbalik dengan transmitan.

Hukum Lambert-Beer dinyatakan dalam rumus sbb :

$$A=e.b.c$$

dimana : A = absorban

e = absorptivitas molar

b = tebal kuvet (cm)

c = konsentrasi

Prinsip kerja alat spektrofotometer uv-vis yaitu sumber radiasi untuk spektroskopi UV-Vis adalah lampu tungsten. Cahaya yang dipancarkan sumber radiasi adalah cahaya polikromatik. Cahaya polikromatik UV akan melewati monokromator yaitu suatu alat yang paling umum dipakai untuk menghasilkan berkas radiasi dengan satu panjang gelombang (monokromator). Monokromator radiasi UV, sinar tampak dan infra merah adalah serupa yaitu mempunyai celah (slit), lensa, cermin dan perisai atau grating (Day, R.A dan Underwood, A.L, 2002).

BAB V

PENUTUP

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang penentuan aktivitas dan tipe aksi inulinase dari isolat A₂-KG bakteri mesofilik dapat disimpulkan

1. Aktivitas inulinase optimum pada pH 4; suhu 40°C dan konsentrasi substrat 2% (w/v).
2. Nilai K_M dan Vmaks inulinase dari isolat A₂-KG adalah 3,12 % (w/v) dan 0,288 U/mL.
3. Inulinase yang ditemukan adalah inulinase yang bertipe endo-inulinase.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, penulis menyarankan untuk melakukan pengujian lebih lanjut mengenai hal-hal berikut ini:

1. Menentukan identifikasi molekuler melalui gen 16 sRNA.
2. Menentukan aktivitas optimum inulinase yang telah dimurnikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Aruna, K and Amita Hati. 2014. *Optimization of Inulinase Production by Bacillus sp. B51f Isolated from Rhizosphere Soil of Agave sisalana*. Int. J. Pure App. Biosci. 2 (3): 161-176.
- Azhar, Minda. 2009. "Inulin Sebagai Prebiotik". *SAINTEK Vol. XII, Nomor 1*
- Azhar, Minda. 2016. *Biomolekul Sel*. Padang: Universitas Negeri Padang.
- Baston, O., & Barna, O. 2013. *Lactic Acid Production by Bactaria Isolated From Rhizosphere of Dahlia Tubers*. Food and Environment Safety : 186 - 191.
- Bintang, Maria. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Campbell, N.A, J.B Reece and L.G Mitchell. 2000. *Biologi Edisi Kelima Jilid 1 terjemahan*. Jakarta: Erlangga
- Day, R.A dan Underwood, A.L. 2002. *Analisis Kimia Kuantitatif*, Erlangga, Jakarta.
- Ertan, F., T. Aktac, A. C. Kaboglu, F. Ekinici & E. Bakar. 2002. *Determination of Optimum Cultivation Condition on The Production of Inulinase from Rhizoctonia solani*. Pak.J. Bio.l Sci 6 (16): 1386-1388.
- Ertan,Figen, Filiz Ekinici dan Tulin Aktac. 2003. *Production of Inulinases from Penicillium spinulosum, Aspergillus parasiticus NRRL2999 and Trichoderma viride*. Takya University, Faculty of Science and Arts, Departement of Biology 22080, Edirne-Turkey
- Ertan, F., Sanal, F.E., Kaboglu, A.C., Aktac, T dan Bakar, E. 2005. "Some Properties of Inulinase from *Rhizoctonia solani*". *Journal of Biological Sciences*. 5(3): 330-334.
- Fessenden. 1982. *Kimia Organik Edisi ketiga Jilid 2*. Penerbit Erlangga , dicetak PT. Gelora Aksara Pratama.
- Franck A. 2006. *Food polysaccharides and their aplication*. CRC Press.
- Goosen, G., Maarel, M.J.E.C. V.D., dan Dijkhuizen, L., 2008. " Exo-inulinase of *Aspergillus niger* N402: A Hydrolytic Enzyme with Significant Transfructosylating Activity". *Biocatalysis and Biotransformation*. 26(1-2): 49-58.