PENENTUAN AKTIVITAS INULINASE BAKTERI PENDEGRADASI INULIN PADA SUBSTRAT INULIN

SKRIPSI

Diajukan sebagai salah persyaratan guna memperoleh gelar

Sarjana Sains

Oleh:
IKRI YANA RIZKI RITONGA
14036007/2014

PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2020

PERSETUJUAN SKRIPSI

PENENTUAN AKTIVITAS INULINASE BAKTERI PENDEGRADASI INULIN PADA SUBSTRAT INULIN

Nama	: Ikri Yana Rizki Ritonga
NIM	: 14036007
Program Studi	: Kimia
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Februari 2020

Mengetahui:	Disetujui oleh
Ketua Jurusan	Dosen Pembimbing
Fitri Amelia, S.Si, M.Si	Prof. Dr.Minda Azhar M.Si
NIP. 19800819 200912 2 002	NIP19641124 199112 2 001

PENGESAHAN UJIAN SKRIPSI

Nama	**: Ikri Yana Rizki Ritonga**
NIM	**: 14036007**
Program Studi	**: Kimia**
Jurusan	**: Kimia**
Fakultas	**: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam**

PENENTUAN AKTIVITAS INULINASE BAKTERI PENDEGRADASI INULIN PADA SUBSTRAT INULIN

Dinyatakan Lulus Setelah dipertahankan di depan Tim Penguji Skripsi
Program Studi Kimia Jurusan Kimia
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, Februari 2020

Tim Penguji

	Nama	**Tanda tangan**
Ketua	**: Prof. Dr.Minda Azhar,M.Si.**	.....
Anggota	**: Drs.Iswendi,M.S**	.....
Anggota	**: Dr. Desy Kurniawati, S.Pd, M.Si**	.....

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertandatangan dibawah ini :

Nama	: Ikri Yana Rizki Ritonga
NIM	: 14036007
Tempat/Tanggal lahir	: Lingga Tiga / 15 November1995
Program Studi	: Kimia
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Judul Skripsi	:**Penentuan Aktivitas Inulinase Bakteri Pendegradasi Inulin pada Substrat Inulin**

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Karya tulis/skripsiini adalah hasil karya saya dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik (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 kepustakaan.
4. Karya tulis/skripsi ini sah apabila telah ditandatangani **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, Februari 2020

Yang menyatakan

Ikri Yana Rizki Ritonga
NIM.14036007

Penentuan Aktivitas Inulinase Bakteri Pendegradasi Inulin pada Substrat Inulin

Ikri Yana Rizki Ritonga

ABSTRAK

Inulin dapat dihidrolisis menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS) menggunakan katalis inulinase. Inulinase dapat diisolasi dari tumbuhan dan mikroorganisme. Aktivitas inulinase didefinisikan sebagai jumlah inulinase yang mengkatalisis pembentukan 1 µmol fruktosa setiap menitnya pada kondisi reaksi tertentu. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan aktivitas optimum dan tipe aksi bakteri pendegradasi inulin pada variasi pH (4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8), suhu (20 ^{0}C; 30 ^{0}C; 37 ^{0}C; 40 ^{0}C; 50^{0}C), variasi konsentrasi substrat adalah (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%). Penentuan aktivitas inulinase bakteri pendegradasi inulin dapat dilakukan menggunakan pereaksi asam dinitrosalisilat (DNS), absorbansi diukur dengan menggunakan Spektrofotometer 20D pada panjang gelombang 510 nm. Hasil yang diperoleh pada penelitian ini adalah aktivitas optimum inulinase bakteri pendegradasi inulin pada substrat inulin yaitu pH 5, suhu 37^{0}C dan konsentrasi substrat 2,5%.

Kata kunci: Inulin, Inulinase, Aktivitas Inulinase

Determination of Activity Inulinase Inulin Degradation Bacteria on Inulin Substrate

Ikri Yana Rizki Ritonga

ABSTRACT

Inulin can be hydrolyzed into fructose and fructooligosaccharide (FOS) using an inulinase catalyst. Inulin can be isolated from plants and microorganism. Inulinase activity is defined as the amount of inulinase which catalyzes the formation of 1 µmol fructose every minute under certain reaction conditions. The purpose of this study was to determine the optimum activity of inulinase inulin degrading bacteria at various pH (4,5; 5; 5,5; 6; 7; 8), temperature temperature (20 ^{0}C; 30 ^{0}C; 37 ^{0}C; 40 ^{0}C; 50^{0}C), the variation in substrate concentration are (0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%). Determination of inulinase activity of inulin degrading bacteria can be done using dinitrosalysilic acid (DNS) reagents, absorbance is measured using a 20D spectrophotometer at a wavelength of 510 nm. The results obtained are optimum inulinase activity that is pH 5, temperature 37^{0}C, and substrate concentration of 2,5%.

Keyword : Inulin, Inulinase, Inulinase Activity

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur atas kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya serta shalawat dan salam untuk Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umatnya kealam yang penuh dengan ilmu pengetahuan seperti sekarang ini, sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi yang berjudul **"Penentuan Aktivitas Inulinase Bakteri Pendegradasi Inulin pada Substrat Inulin".** Skripsi ini diajukan untuk melengkapi dan memenuhi persyaratan mata kuliah Tugas Akhir 2 sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains pada Program Studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Penulisan Skripsi ini tidak lepas dari bantuan, arahan dan masukan dari berbagai pihak. Untuk itu pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si selaku pembimbing sekaligus penasehat akademik.
2. Bapak Drs. Iswendi, M.S., dan Ibu Dr. Dessy Kurniawati, M.Si selaku dosen pembahas Skripsi.
3. Bapak Alizar, S.Pd., M.Sc., Ph.D selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang.
4. Ibu Fitri Amelia S.Si, M.Si selaku sekretaris Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang.
5. Bapak Umar Kalmar Nizar, S.Si, M.Si, Ph.D selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Negeri Padang.

6. Staf laboratorium jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

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, Januari 2020

`

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK……. i
KATA PENGANTAR……..... iii
DAFTAR ISI……..... v
DAFTAR TABEL……..... vi
DAFTAR GAMBAR…….. vii
DAFTAR LAMPIRAN……..... ix
BAB I PENDAHULUAN……..... 1
A. Latar Belakang……..……..... 1
B. Rumusan Masalah……..... 3
C. Batasan Masalah…….. 3
D. Tujuan Penelitian……..... 3
E. Manfaat Penelitian……..... 3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA…….. 5
A. Inulin……..……..... 5
B. Sifat Inulin……..... 6
C. Inulinase……..... 7
D. Aktivitas Inulinase……..……..... 7
E. Metoda DNS ……..…….. 10
F. Spektrofotometri UV-Vis……..... 11
BAB III METODA PENELITIAN…….. 13
A. Waktu dan Tempat Penelitian……..…..... 13
B. Objek Penelitian……..…. 13
C. Alat dan Bahan ……. 13
1. Alat……..... 13
2. Bahan……. 13
D. Prosedur Penelitian……..... 13
E. Prosedur Kerja……..…..... 15
1. Pembuatan Media Padat……..... 15
2. Pengujian Media Cair……..…… 15
3. Ekstraksi *Crude* Inulinase …… 16
4. Pengujian Inulinase……..... 16
5. Pengukuran Absorbansi Larutan Standart Fruktosa……..... 16
6. Penentuan Aktivitas Inulinase……..... 17
F. Teknik Analisis Data ……..…….. 17
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN……..... 19
A. Hasil……..... 19
B. Pembahasan……..……..... 21
BAB V PENUTUP……..……..... 26
A. Kesimpulan……..……. 26

B. Saran……..……..... 26
DAFTAR PUSTAKA…….……..... 27
LAMPIRAN……..... 31

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Nilai pH Optimum pada Produksi Inulinase dari Mikroorganisme..... 9
2. Volume Larutan Standart Fruktosa……..... 41
3. Absorbansi Larutan Standart Fruktosa pada λ 510 nm 47
4. Absorbansi Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi pH …….. 47
5. Aktivitas Inulinase pada Variasi pH..... 48
6 Absorbansi Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu (pH 5)..... 48
7. Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu..... 48
8. Absorbansi Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Substrat…….. 49
9. Aktivitas Inulinase pada Variasi Konsentrasi Substrat..... 49

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Struktur Inulin……..……... 5
2. Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS..... 10
3. Spektrometer UV-Vis..... 12
4. Kurva Standart Larutan Fruktosa…….……. 19
5. Grafik Aktivitas Inulinase pada Variasi pH…….. 20
6. Grafik Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu..... 20
7. Grafik Aktivitas Inulinase pada Variasi Konsentrasi Substrat…….. 21
8. Pembuatan Single Koloni Bakteri Asam Laktat …….…….. 49
9. Kultur Bakteri pada Media Cair…… 49
10. *Crude* Enzim setelah disentrifugasi..... 51
11. Deret Larutan Standar Fruktosa 200–800 µg/mL..... 51
12. Deret Larutan pada Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi pH..... 52
13. Deret Larutan pada Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu.... 52
14. Deret Larutan padaPenentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Substrat 52

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Halaman**

1. Pembuatan Media Padat..... 31
2. Pembuatan Media Cair..... 33
3. Ekstrak Crude Inulinase..... 34
4. Hasil Pengujian Inulinase..... 35
5. Pengukuran Absorbansi Larutan Standart Fruktosa..... 35
6. Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi pH..... 36
7. Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu..... 37
8. Penentuan Aktivitas Inulinase pada Variasi Konsentrasi Substrat..... 38
10. Perhitungan..... 38
11. Pengelolaan Data……..……. 47
12. Dokumentasi Penelitian……... 50

BAB I
PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Saat ini bahan pangan tidak hanya dituntut untuk dapat memenuhi kebutuhan dasar manusia, tetapi diharapkan juga dapat berfungsi sebagai kesehatan manusia. Oleh karena itu, dikalangan masyarakat dunia lahirlah konsep pangan fungsional. Produk pangan fungsional telah banyak ditemui di Indonesia saat ini baik yang diproduksi didalam negeri maupun impor. Salah satu golongan senyawa yang termasuk pangan fungsional adalah inulin.

Inulin dapat ditemukan dari produk alami yang berasal dari umbi dahlia, akar *chicory*, dan *jerussalem arthicoke*. Tanaman tersebut memiliki jumlah kandungan inulin yang cukup besar sehingga sering dimanfaatkan untuk produksi inulin secara komersial. Akan tetapi, di Indonesia hanya umbi dahlia yang dapat cocok untuk dikembangkan (Manguwidjaja, 2009).

Hidrolisis molekul inulin menghasilkan fruktosa atau hidrolisis parsialnya menghasilkan FOS dengan memutus ikatan β (2-1) fruktofuranosida. Selain dari inulin, produk fruktosa juga dapat dihasilkan dari pati. Akan tetapi, produksi yang berasal dari pati memiliki randemen maksimum ±45% fruktosa. (Workman dan Day, 1993; Gupta, 1990), sedangkan proses produksi fruktosa dengan bahan baku inulin hanya melalui satu tahapan proses yakni hidrolisis inulin menggunakan inulinase yang dapat menghasilkan randemen fruktosa sekitar 90-95% (Mansfeld *et al* , 1992).

Enzim yang digunakan untuk mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa dan FOS disebut inulinase dengan memutus ikatan glikosida pada molekul inulin (Singh dan Singh, 2010). Inulinase dapat diisolasi dari mikroorganisme (bakteri, kapang, khamir, ragi) maupun tanaman (umbi dahlia, akar *chicory*, *jerussalem arthicoke*).

Inulinase yang diisolasi dari fungi yaitu *Aspergillus awamori, Sterigmatocystis nigra, Penicillium sp. I.* Inulinase yang diisolasi dari bakteri adalah *Lactobacillus plantarum*, sedangkan pada ragi dapat ditemukan pada *Candida kefyr, Candida salmenticensis, Kluyveromyces fragilis , Debaromyces cantarelli, dan D. phaffii* (Vandame dan Derycke, 1983). Pada penelitian ini, *crude* inulinase yang digunakan dari isolat bakteri asam laktat (BAL) yang berasal dari dadih.

Penentuan jumlah produk inulinase yang dihasilkan, dapat dilakukan dengan uji aktivitas inulinase. Aktivitas inulinase didefenisikan sebagai jumlah inulinase yang mengkatalisis pembentukan 1 µmol fruktosa setiap menitnya pada kondisi reaksi tertentu. Aktivitas inulinase dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor, diantaranya adalah pH, suhu, dan konsentrasi substrat (Azhar, 2016).

Inulinase yang berasal dari sumber yang berbeda akan menghasilkan aktivitas yang berbeda. Berdasarkan penelitian sebelumnya, inulinase cenderung aktif pada suasana asam (4,5-6,0). Inulinase yang diproduksi dari bakteri *Bacillus sp*. memiliki aktivitas optimum pH 8 dengan suhu 50^0C, *Aspergillus sp* memiliki aktivitas optimum pada pH 5 dengan suhu 45-55 ^{0}C. Inulinase yang berasal dari *Pseudomonas mucidolens* optimum pada pH 6 dengan suhu 55 ^{0}C (Trytek, 2015). Perubahan pH dapat merubah konformasi enzim, gugus pada posisi aktif maupun pengikatan enzim substrat (Wiseman,1985).

Instrumen yang digunakan untuk mendeteksi adanya gula pereduksi yang dihasilkan akibat aktivitas inulinase antara lain spektrofometeri UV Vis. Untuk mengetahui kadar gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi enzimatis inulinase digunakan asam dinitro salisilat (DNS). Asam dinitro salisilat (DNS) jika bereaksi dengan gula pereduksi akan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat (Miller, 1959). Reaksi gula pereduksi dengan reagen DNS merupakan reaksi redoks dimana gugus aldehid akan teroksidasi menjadi

karboksil, sedangkan DNS akan tereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat (Kusmiati dan Agustini, 2010).

Inulinase yang dihasilkan dari sumber yang berbeda akan menghasilkan pH, suhu dan konsentasi substat optimum yang berbeda. Berdasarkan uraian di atas, penulis tertarik untuk menentukan aktivitas inulinase yang diekstrak dari isolate bakteri asam laktat (BAL). Oleh sebab itu penulis melakukan penelitian yang berjudul **" Penentuan Aktivitas Bakteri Pendegradasi Inulin pada Substrat Inulin "**

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini yaitu bagaimana aktivitas inulinase bakteri pendegradasi inulin pada substrat inulin?

C. Batasan Masalah

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

a. Variasi pH yang digunakan adalah 4,5; 5,5 ; 6; 7; 8.
b. Variasi suhu yang digunakan adalah 20^0C; 30^0C; 37^0C; 40^0C; 50^0C.
c. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,1 %; 1%; 1,5%; 2%; dan 2,5%.

D. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menentukan aktivitas optimum enzim inulinase pendegradasi inulin pada variasi pH, suhu, dan konsentrasi substrat.

E. Manfaat Penelitian

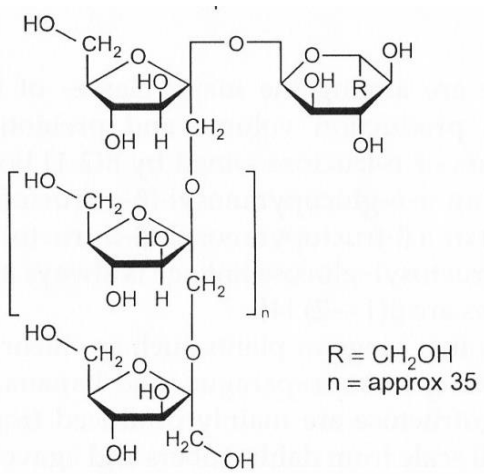
Manfaat dari penelitian ini adalah:

1. Memberikan informasi tentang aktivitas optimum inulinase bakteri pendegradasi inulin.
2. Memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan tentang aktivitas optimum enzim inulinase bakteri pendegradasi enzim inulinase pada substrat inulin.

BAB II
TINJAUAN PUSTAKA

A. Inulin

Inulin diidentifikasi pertama kali pada tahun 1800-an oleh *scientic* Jerman yang bernama Valentine Rose sebagai senyawa karbohidrat yang berasal dari akar tumbuhan *Inula helenium*. Inulin merupakan kelompok karbohidrat polimer alami yang merupakan monomer dari fruktosa. Inulin dikenal sebagai fruktan yang termasuk serat karena tidak dapat dicerna oleh sistem pencernaan manusia akan tetapi baik digunakan sebagai makanan serat. Pada satu rantai polimer terdapat jumlah monomer fruktosa yang bervariasi tergantung dari sumbernya. Antara monomer fruktosa pada inulin dihubungkan oleh ikatan (2→1) residu β-D-fructofuranosyl. Tiap ujung pereduksi untai polimer inulin dapat hadir glukosa yang terhubung dengan fruktosa (Nines, 1999). Struktur inulin dimuat pada Gambar 1.



Gambar 1.Struktur inulin (Roberfoid, 2008).

Jadi, secara umum polimer inulin diasumsikan sebagai GFn yaitu fruktan dengan ujung terminal glukosa atau Fn tanpa ujung terminal glukosa. G merupakan unit terminal

glukosa, F adalah unit fruktosa dan n adalah jumlah unit fruktosa yang berikatan satu sama lain atau derajat polimerisasi (DP) (Sebastien, 2007).

Inulin ditemukan dari tumbuhan seperti *In Liliaceae, Amaryllidaceae* dan *Compositae*. Kelompok tanaman seperti umbi dahlia *(Dahlia sp L), jerussalem artichoke*, akar *chicory,* umbi yacon (*Chicoryum intybus L*), dandelion (*Taraxacum offinale weber*) mempunyai nilai kandungan inulin dalam jumlah yang besar.

Akan tetapi, di Indonesia yang paling banyak ditemukan dan dikembangkan adalah inulin yang terdapat pada umbi dahlia. Sementara *akar chicory* dan *jerussalem arthicoke* banyak ditemukan diluar negeri seperti Amerika Utara. Inulin juga ditemukan pada bawang- bawangan seperti bawang putih, bawang merah, pisang, asparagus dan gandum dalam jumlah yang kecil (Setiarto, 2016 ; Yang Li, 2012).

B. Sifat Inulin

Inulin dideskripsikan oleh Steinbuchel dan Rhee (2005) sebagai bubuk granula putih yang bersifat amorf, tidak berbau, memiliki rasa netral hambar, dan higroskopik. Berat molekul inulin merupakan polimer yang tergantung jumlah monomernya. Inulin larut dalam air panas namun sukar larut dalam air dingin. Kelarutan inulin dalam air disebabkan interaksi gugus hidroksi dari molekul inulin dengan air. Standart inulin adalah sedikit manis (lebih manis 10% dibandingkan gula) (Franck, 2002). Inulin dapat dihidrolisis menghasilkan fruktosa dan FOS menggunakan katalis inulinase (Vandamme dan Derycke, 1983).

Inulin dikelompokkan sebagai prebiotik yakni substrat yang tidak dapat dihidrolisis oleh enzim dalam sistem pencernaan manusia, sehingga sampai diusus besar tidak mengalami perubahan struktur (Huebner, 2007). Inulin juga dapat meningkatkan stabilitas emulsi yang dapat digunakan sebagai pengganti bahan penstabil dalam produk susu, es krim, saus, mayones (Karimi, 2015).

C. Inulinase

Enzim hidrolitik yang dapat mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa atau FOS disebut inulinase. Inulinase dapat ditemukan pada tumbuhan dan mikroorganisme. Mikroorganisme merupakan sumber yang sangat efisien untuk produksi inulinase. Beberapa mikroorganisme penghasil inulinase yang berasal dari jamur diantaranya *Aspergillus sp*, *Penicilliumsp*, *Kluyveromyces sp*, dan *Bacillus sp*. Mikroorganisme ini menghasilkan enzim intraseluler dan enzim ekstraseluer (Singh dan Singh, 2010).

Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan luar sel dengan cara filtrasi atau sentrifugasi. Enzim ekstraseluler ini bekerja di luar sel. Enzim intraseluler merupakan enzim yang langsung digunakan di dalam sel ditemukan pada bagian membran dari sebuah organel sel. Enzim intraseluler dapat diekstrak dari dalam sel lewat proses pemecahan sel (Lehninger, 2004).

Inulinase yang diisolasi dari tanaman (umbi dahlia, akar c*hycory*, *jerusalem artichoke*) kurang potensial dan jumlahnya relatif sedikit dibandingkan dengan inulinase yang diisolasi dari mikroorganisme (kapang, khamir dan bakteri) (Singh, 2014 ; Vandame dan Derycke, 1983). Inulinase yang diisolasi dari bakteri lebih menguntungkan karena menghasilkan jumlah yang lebih banyak dan budidaya lebih murah.

D. Aktivitas Inulinase

Aktivitas inulinase didefenisikan sebagai jumlah inulinase yang mengkatalisis pembentukan 1 µmol fruktosa setiap menitnya pada kondisi reaksi tertentu (Azhar, 2016). Nilai aktivitas inulinase sangat berhubungan dengan gula pereduksi yang dihasilkan. jika nilai nilai aktivitas inulinase semakin tinggi, maka gula pereduksi yang dihasilkan semakin banyak. Sebaliknya jika nilai aktivitas inulinase rendah, maka gula pereduksi yang dihasilkan semakin sedikit (Susilowati, 2014).

Penentuan aktivitas inulinase dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Aktivitas Enzim} = \frac{[X]}{\text{Mr Fruktosa.t}}\ \text{Unit/mL}$$

[X] = Jumlah gula pereduksi (µg/mL)

t = Waktu inkubasi (menit)

Mr Fruktosa = 180,1

1. Faktor yang Mempengaruhi Aktivitas Inulinase

Aktivitas inulinase dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pH, suhu, konsentrasi substrat, dan waktu inkubasi. Oleh karena itu, perlu dilakukan optimalisasi aktivitas inulinase dengan mengkombinasikan beberapa variabel dari aktivitas enzim tersebut yang bertujuan untuk memaksimalkan aktivitas enzim inulinase (Purwanti, 2015).

Suhu dan pH adalah salah satu faktor yang sangat mempengaruhi akitivitas inulinase. Suhu adalah faktor utama penentu stabilitas enzim, terutama karena degradasi inulin lebih efektif pada suhu tinggi. Aktivitas suatu enzim akan meningkat dengan adanya kenaikan suhu. Konsentrasi substrat juga mempengaruhi aktivitas suatu enzim, jika suatu substrat ditambahkan, maka aktivitas enzim mula-mula akan meningkat (Page, 1997).

Suhu optimal untuk produksi inulinase pada *Caindida kefyr* adalah 27-30^{0}C, pada *Penicilium sp 1* aktivitas optimal diperoleh setelah 72 jam pertumbuhan yaitu pada suhu 30- 33^{0}C, *Kluyueromyces fragilis* aktivitas tinggi terjadi pada suhu 30- 34°C (Vandame dan Derycke, 1983).

Suhu yang tinggi mengakibatkan penurunan produksi inulinase dan aktivitas enzim. Penurunan aktivitas enzim dapat terjadi karena struktur molekul enzim mengalami denaturasi (Lehninger, 1993). Interaksi ionik yang kmterjadi dalam struktur enzim akan mempengaruhi stabilitasnya dan menyebabkan enzim memungkinkan untuk mengenali dan berikatan dengan substratnya. Kondisi pH juga sangat menentukan enzim yang dihasilkan

oleh mikroorganisme. Kondisi keasaman di bawah atau di atas pH optimum dapat mempengaruhi aktivitas enzim yang dihasilkan (Nelson dan Cox, 2005). Inulin dapat dihidrolisis dengan menggunakan pH sekitar 1,0- 2,0 dengan suhu 80- 100°C (Singh, 2006). Nilai aktivitas enzim pada pH optimum yang diproduksi dari jamur, ragi, dan bakteri dimuat pada Tabel 1.

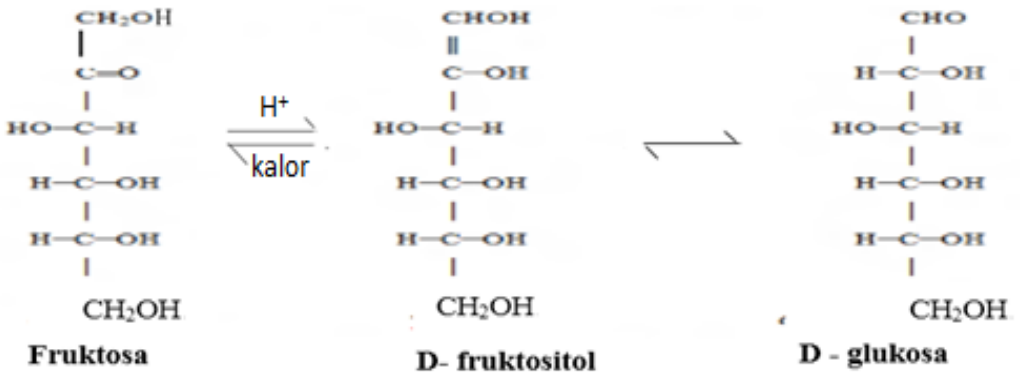
Tabel 1. Nilai pH optimum pada produksi inulinase dari beberapa mikroorganimse

Produksi Inulinase	**pH Optimum**	***Reference***
A. Jamur		
Aspergilus niger	3,8	Snyder and Phaff
Aspergillus niger 12 T.III	5,3	(1960)
Aspergillus niger 12 T.II	5	Negoro and Kit
Aspergillus sp	4,5	(1973)
Penicillium sp T.I	4,5	
Penicillium sp T.II	5,0	Guiraud dan Galzy
Penicillium sp T.III	4,0	(1981)
Talaromyces flavus	4-5	
B. Ragi		
Kluyoeromyces fragilis	5	Belucbe *et al* (1980)
Candida kefyr	4,5	
Candida salmenticensis	3,5	Guiraud *et al* (1982)
Debaryomyces cantarellii T. I	4,0	
Debaryomyces cantarellii	6,0	Demeulle *et al* (1981)
Debaryomyces phaffii	4,0	
C. Bakteri		Uchiyama *et al.*(1973)
Arthrobacter ureafaciens T. I1	6,0	

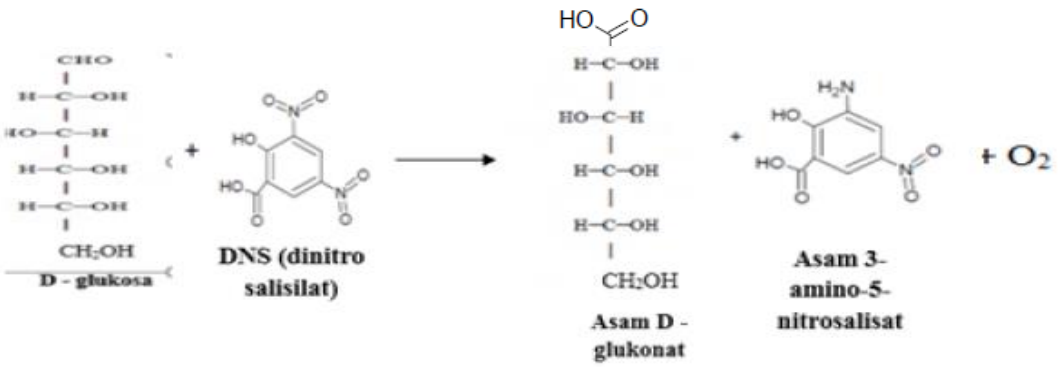
E. Metoda DNS

Analisis inulinase dapat dilakukan secara kuantitatif yaitu menghitung kadar gula pereduksi dengan menggunakan reagen DNS *(Dinitrosalisilic acid)* dari aktivitas inulinase. Reaksi gula pereduksi dengan reagen DNS merupakan reaksi redoks, dimana gugus aldehid bertindak sebagai pereduksi akan teroksidasi menjadi karboksil, DNS akan tereduksi membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat yang bertindak sebagai oksidator. Asam 3-amino-5-nitrosalisilat dapat dideteksi dengan spectrometer pada panjang gelombang maksimum 500 nm (Kusmiati dan Agustini, 2010). Jika terdapat gula pereduksi dalam sampel, larutan DNS yang mulanya berwarna kuning akan bereaksi dengan gula pereduksi sehingga menimbulkan warna jingga kemerahan. Reaksi ini biasanya terjadi pada suhu yang tinggi (100 ^{0}C dalam suasana basa). Reaksi fruktosa dengan reagen Reagen DNS dapat bereaksi dengan inulin dimuat pada Gambar dibawah 2.

Tahap I : Tautomerik



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



Gambar 2. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS (Miloski, *et al*. 2008)

F. Spektrofotometri UV-Vis

Spektrometer adalah instrumen untuk mengukur penyerapan cahaya dengan energi (panjang gelombang) oleh suatu atom atau molekul. Molekul dalam energi ini akan mengalami energi transisi elektron. Bagian utama dari spektrometer ada empat yaitu monokromator, sumber sinar, detektor, kuvet. Cahaya putih dari sumber sinar akan dilewatkan melalui monokromator sehingga sinar mempunyai panjang gelombang tertentu. Radiasi yang keluar akan difokuskan melalui detektor yang mengubah radiasi menjadi sinyal-sinyal listrik (Skoog, 2007; Cazes, 2005).

Spektrometer UV Vis merupakan salah satu teknik analisis spektrometer yang sangat berguna untuk pengukuran secara kuantitatif. Konsentrasi dari analit didalam larutan bisa ditentukan dengan mengukur absorban pada λ tertentu berdasarkan Hukum Lambert Beer.

HukumLambert Beer dinyatakan dalam rumus yaitu:

A= e.b.c

Dimana: A= absorban

e= absorptivitas molar

b= tebal kuvet

c= konsentrasi

Hukum Lambert Beer menyatakan hubungan linearitas antara absorban dengan konsentrasi larutan analit dan berbanding terbalik dengan transmitan (Skoog, 2007). Prinsip kerja spektrometer adalah berdasarkan Hukum Lambert Beer, bila cahaya monokromatik melalui suatu media (larutan) maka sebagian cahaya dapat dipantulkan, diserap, dan sebagian lagi dipancarkan. Bagian dalam spektrofotometer sinar dari sumber cahaya dibagi menjadi dua berkas oleh cermin yang berputar. Berkas pertama akan melewati kuvet yang berisi blanko. Kemudian berkas kedua melewati kuvet berisi sampel.Adanya blanko berguna untuk menstabilkan absorbsi akibat perubahan voltase dari

sumber cahaya. Blanko dan sampel akan diperiksa secara bersamaan. Spektrofotometri UV-Vis dimuat pada Gambar 4.

Gambar 3. Spektrometer UV- Vis (Gandjar dan Rohman, 2007).

BAB V
KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan tentang penentuan aktivitas dan tipe aksi inulinase bakteri pendegradasi inulin pada substrat inulin dapat disimpulkan :

1. Aktivitas optimum inulinase yang diisolasi dari isolat bakteri asam laktat (BAL) adalah pH 5,5 ; suhu 37°C, dengan konsentrasi 2,5 % (w/v).

B. Saran

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

1. Menentukan identifikasi molekular melalui gen 16sRNA.

DAFTAR PUSTAKA

Allais, J,J., G. Hoyos-Lopez and J. Baratti. 1987. *"Characterization and Properties of an lnulinase from a Thermophilic Bacteria". Carbohydrate Polymers* 0144-8617/87/S03.50

Azhar, Minda. (2016). *Biomolekul sel : Karbohidrat, Protein, dan Enzim.* Padang : UNP Press.

Campbell, N.A, J.B Reece and L.G Mithchell.2000. *Biologi Edisi Kelima Jilid I Terjemahan*. Jakarta: Erlangga.

Castro, G.R., M.D. Baigori and F.Sineriz, 1995. *A plate technique for screening of inulin degradingmicroorganisms. J. Microbiol*. Meth., 22: 51-56.

Cazes, J., 2005. *Ewing's Analytical Instrumention Handbook Third Edition*. New York: Marcel Dekker, Inc. Vol : 127-139.

Chandra, Utami, Sudarwanto MB., Lukman DW., Wientarsih,. 2017. *Karakteristik dan Pengembangan Dadih dari Susu Sapi Sebagai Alternatif Dadih Susu Kerbau*. Wartazoa Vol 27 No.2.

Copeland RA,. 1996. Enzymes: *A Practical Introduction to Structure Mechanism and Data Analysis.* New York: Wiley-VCH.

Franck, A. 2002.*Technological Functionality of Inulin and Oligofructose in British*Journal of Nutrition Vol: 87. Suppl. 2, S287–S291.

Gao, L.M., Z.M. Chi., J. Sheng., Wang., J. Li., F. Gong. (2008). *Inulinase-Producing Marine Yeasts: Evaluation of Their Diversity and Inulin Hydrolysis by Their Crude Enzymes.* Microbiol, Ecol, 54, 722e729.

Gandjar, I. G, Rohman, A. 2007. *Kimia Farmasi Analisis*. Cetakan II. Yogyakarta: Pustaka Belajar. Hal : 246.

Grimoud, J., Durand, H., Courtin, C., Monsan,P., Ouarné, F., Theodorou, V. &Roques, C. (2010). *In vitro Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Prebiotic Glucooligosaccharides to Select Effective Synbiotics.Anaerobe.* 16 (493–500).

Gupta A. K., P. Rathore, N. Kaur and R. Singh.1990.*Production ThermalStability and Immobilization of Inulinase From Fusariumoxysporum*. J. Chem. Tech. Biotechnol., 45: (245-251).

Hasono, A.R. Wardoyo and H. Otani. 1989. *Microbial Flora in Dadih, a Traditional Fermented Milk in Indonesia.* Lebensm-Wiss. Technol. 22:20-24.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath P.H.A., Staley, J.Y., and William, A.T. 1994. *Bergeys Manual of Determinative Bacteriology*. Lippicolt William and Wilkins., New York.