

**PENENTUAN AKTIVITAS OPTIMUM DAN TIPE AKSI ENZIM
EKSTRASELULER PENGHIDROLISIS INULIN DARI BAKTERI
RIZOSFER UMBI DAHLIA (*Dahlia sp.*)**

SKRIPSI

*Diajukan kepada Tim Pembahas Skripsi Jurusan Kimia sebagai Salah Satu
Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains*



Oleh

**NILAM MAULANI
16036097**

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

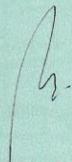
2018

PERSETUJUAN SKRIPSI
PENENTUAN AKTIVITAS OPTIMUM DAN TIPE AKSI ENZIM
EKSTRASELULER PENGHIDROLISIS INULIN DARI BAKTERI
RIZOSFER UMBI DAHLIA (*Dahlia sp.*)

Nama : Nilam Maulani
Nim : 16036097
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 Optimum dan Tipe Aksi Enzim
Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin dari Bakteri Rizosfer
Umbi Dahlia (*Dahlia sp.*)**

Nama : Nilam Maulani

NIM : 16936097

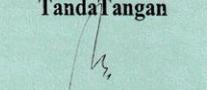
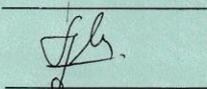
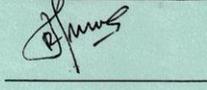
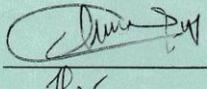
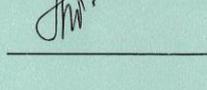
Program Studi: Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Agustus 2018

Tim Penguji

Nama	TandaTangan
1. Ketua : Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si	
2. Sekretaris : Dra. Sri Benti Etika, M.Si	
3. Anggota : Dra. Iryani, M.S	
4. Anggota : Ananda Putra, M.Si, Ph.D	
5. Anggota : Hary Sanjaya, M.Si	

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Nilam Maulani
TM/NIM : 16036097/2016
Tempat/Tanggal Lahir : Padang / 7 September 1993
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : MIPA
Alamat : Jl. Kampung Baru Bawah Asam RT03 RW02 Kel. Sei Sapih Kec. Kuranji Kota Padang
No.HP/Telepon : 082383837339
Judul Skripsi : Penentuan Aktivitas Optimum dan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia sp.*)

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,

Nilam Maulani
NIM : 16036097

ABSTRAK

NILAM MAULANI : Penentuan Aktivitas Optimum dan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia sp.*)

Enzim inulinase merupakan suatu enzim ekstraseluler yang terlibat dalam reaksi hidrolisis inulin menghasilkan fruktosa dan fruktooligosakarida. Aktivitas inulinase adalah jumlah inulinase yang diperlukan untuk menghasilkan satu μ mol gula pereduksi per menit pada kondisi tertentu. Aktivitas enzim ekstraseluler ini dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, suhu dan konsentrasi substrat. Tujuan dari penelitian adalah untuk menentukan aktivitas optimum dan tipe aksi enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin pada variasi pH (4,5; 5; 5,5; 6; 7; dan 8), suhu (20 °C; 30 °C ; 37 °C; 40 °C; 50 °C) dan konsentrasi substrat (0,5%; 1%; 1,5%; 2% dan 2,5%) dengan waktu inkubasi 30 menit, dimana absorbansinya diukur dengan menggunakan Spektrometri 20 D pada λ 500 nm . Objek pada penelitian ini adalah crude inulinase dari bakteri penghidrolisis inulin. Selain itu, untuk penentuan tipe aksi enzim ekstraseluler dilakukan dengan metoda Kromatografi Lapis Tipis (KLT). Aktivitas enzim ekstraseluler yang diperoleh dari penelitian ini adalah enzim ekstraseluler memiliki kondisi optimum pada pH 5,0; suhu 37°C dan konsentrasi substrat 2,5%. Tipe aksi enzim ekstraseluler yang diperoleh adalah endoinulinase.

Kata kunci : *Enzim inulinase, Enzim ekstraseluler, Aktivitas enzim ekstraseluler, Inulin dan Tipe Aksi enzim ekstraseluler.*

KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya serta salawat dan salam untuk junjungan kita Nabi Muhammad SAW yang telah membawa umatnya ke alam yang penuh dengan ilmu pengetahuan seperti sekarang ini, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Penentuan Aktivitas Optimum dan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (*Dahlia sp.*)”**. Skripsi ini diajukan untuk melengkapi dan memenuhi persyaratan kelulusan dalam rangka memperoleh gelar sarjana S-1 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 terima kasih kepada :

1. Ibu Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si selaku pembimbing I sekaligus penasehat akademik.
2. Ibu Dra. Sri Benti Etika, M.Si selaku pembimbing II.
3. Bapak Dr. Mawardi, M.Si selaku Ketua Jurusan Kimia Universitas Negeri Padang.
4. Bapak Hary Sanjaya, S.Si, M.Si selaku Ketua Program Studi Kimia Universitas Negeri Padang dan sekaligus sebagai dosen penguji skripsi.
5. Bapak Ananda Putra, S.Si, M.Si, PhD dan Ibu Dra. Iryani, M.S selaku dosen penguji skripsi.

6. Kedua Orang Tua penulis beserta keluarga yang telah memberikan semangat serta dorongan kepada penulis dalam menyelesaikan perkuliahan ini.
7. Teman-teman kimia tahun 2014 yang telah memberikan masukan kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Semoga bantuan dan bimbingan yang telah diberikan menjadi amal sholeh bagi Bapak/Ibu serta mendapat balasan yang berlipat ganda dari Allah SWT. Atas kritik dan saran yang telah diberikan, penulis mengucapkan terima kasih.

Padang, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
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 Rizosfer Umbi Dahlia	5
2.2 Inulin	6
2.3 Enzim Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin	7
2.4 Aktivitas dan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin	8
2.5 Spektrofotometer	10
2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)	11
2.7 Reagen DNS (Dinitrosalisilat)	12
BAB III METODA PENELITIAN	15
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	15
3.2 Objek Penelitian	15
3.3 Alat dan Bahan	15
3.3.1 Alat	15
3.3.2 Bahan	15
3.4 Prosedur Kerja Penelitian	16
3.4.1 Pembuatan Reagen	16
3.4.2 Prosedur Kerja	18
3.4.2.1 Ekstraksi Crude Enzim Ekstraseluler	18
3.4.2.2 Pengujian Enzim Ekstraseluler	19
3.4.2.3 Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fruktosa	19
3.4.2.4 Penentuan Aktivitas Enzim Ekstraseluler	20
3.4.2.5 Penentuan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler	20
3.5 Teknis Analisis Data	21
3.6 Desain Penelitian	23
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	24
4.1 Hasil	24
4.2 Pembahasan	25
4.2.1 Aktivitas Enzim Ekstraseluler	25
4.2.2 Penentuan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler	31
BAB V PENUTUP	34
5.1 Kesimpulan	34

5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	38

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi yang terkandung dalam Umbi Dahlia	5
2. Volume larutan standar fruktosa pada λ 500 nm	58
3. Absorbansi larutan standar fruktosa pada λ 500 nm	58
4. Absorbansi penentuan aktivitas enzim ekstraseluler pada variasi pH (suhu ruang)	58
5. Aktivitas enzim ekstraseluler pada Variasi pH	59
6. Absorbansi penentuan aktivitas enzim ekstraseluler pada variasi suhu (pH 5).....	59
7. Aktivitas enzim ekstraseluler pada Variasi Suhu.....	59
8. Absorbansi penentuan aktivitas enzim ekstraseluler pada variasi Konsentrasi substrat (pH 5 dan suhu 37°C)	60
9. Aktivitas enzim ekstraseluler pada Variasi Konsentrasi Substrat....	60

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Inulin	6
2. Inulin dari Umbi Dahlia	7
3. Komponen Alat Spektrofotometer UV-Vis	11
4. Reaksi Fruktosa dengan Reagen DNS	13
5. Kurva Standar Larutan Fruktosa	24
6. Grafik aktivitas enzim ekstraseluler pada variasi pH.....	26
7. Grafik aktivitas enzim ekstraseluler pada variasi suhu	28
8. Grafik aktivitas enzim ekstraseluler pada variasi konsentrasi substrat	29
9. Kurva pemetaan Lineweaver-Burk	31
10. Hasil Kromatografi Lapis Tipis	32
11. Pembuatan Single Koloni Bakteri UKG dari bakteri Rizosfer Umbi Dahlia	61
12. Kultur Bakteri UKG pada Media Cair	61
13. Crude Enzim UKG setelah disentrifugasi	62
14. Deret Larutan Standar Fruktosa 100 – 900 µg/mL	63
15. Deret Larutan pada Penentuan Aktivitas enzim ekstraseluler variasi pH	63
16. Deret Larutan pada Penentuan Aktivitas enzim ekstraseluler variasi Suhu	63
17. Deret Larutan pada Penentuan Aktivitas enzim ekstraseluler variasi Konsentrasi Substrat	63

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Pembuatan Media Padat	38
2. Pembuatan Media Cair	39
3. Ekstrak Crude Enzim Ekstraseluler	40
4. Hasil Pengujian Enzim Ekstraseluler	41
5. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fruktosa	42
6. Penentuan Aktivitas Enzim Ekstraseluler pada Variasi pH	43
7. Penentuan Aktivitas Enzim Ekstraseluler pada Variasi Suhu	44
8. Penentuan Aktivitas Enzim Ekstraseluler pada Variasi Konsentrasi Substrat	45
9. Penentuan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler	46
10. Perhitungan	47
11. Tabel Hasil Pengukuran	58
12. Dokumentasi Hasil Penelitian	61

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pemanfaatan enzim di bidang industri sangat pesat, khususnya pada industri pangan. Salah satu enzim yang dapat digunakan dalam industri pangan adalah enzim inulinase. Enzim inulinase merupakan suatu enzim ekstraseluler yang terlibat dalam reaksi hidrolisis inulin menghasilkan fruktosa dan fruktooligosakarida. Fruktosa yang dihasilkan dari reaksi hidrolisis inulin menggunakan inulinase dapat mencapai 98% (Zittan, 2006).

Enzim ekstraseluler dapat ditemukan dari golongan jamur *Aspergillus niger*, *Aspergillus ficuum*, *Penicillium sp*, *Fusarium oxyporum* dan *Chrysosporium pannorum*, dari golongan ragi seperti *Kluyveromyces marxianus*, *Candida kefyri*, dan *Debaryomyces cantarelli* serta dari golongan bakteri seperti *Clostridium acetobutylicum*, *Pseudomonas sp* dan *Staphylococcus sp* (Pandey *et al.*, 1999). Selain itu, mikroorganisme penghasil enzim ekstraseluler juga dapat diisolasi dari tanah yang menempel dipermukaan umbi dahlia (rizosfer) dan akar tanaman yang mengandung inulin seperti Jerrusalem artichoke.

Di Indonesia tanaman dahlia dapat ditemukan di Pulau Jawa dan Sumatera. Salah satunya adalah Sumatera Barat tepatnya di daerah Padang Panjang, Bukittinggi dan Solok (Azhar, 2009). Umbi dahlia ini dapat diekstrak menghasilkan inulin. Namun, inulin tidak hanya dapat ditemukan pada umbi dahlia saja. Beberapa tumbuhan seperti umbi Jerrusalem artichoke dan chicory juga mengandung inulin.

Pada penelitian ini, sampel crude enzim ekstraseluler yang digunakan adalah crude enzim dari isolat Bakteri UKG Kabupaten Solok yang merupakan koleksi laboratorium. Isolat bakteri UKG ini tergolong kedalam kelompok bakteri mesofil penghidrolisis inulin.

Enzim ekstraseluler dengan substrat inulin mempunyai 2 tipe aksi yaitu endoinulinase dan eksoinulinase. Endoinulinase memotong ikatan β -2,1 secara acak dengan menghidrolisis ikatan internal pada inulin menghasilkan fruktooligosakarida (FOS), sedangkan eksoinulinase memotong ikatan β -2,1 pada posisi terminal menghasilkan fruktosa. Produk hidrolisis inulin ini dapat ditentukan dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT) (Singh dan Singh, 2010).

Aktivitas enzim ekstraseluler dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti pH, suhu dan konsentrasi substrat. Aktivitas enzim ekstraseluler cenderung terjadi pada pH asam yaitu sekitar 4-5 dan optimum pada pH 4,5 (Whitaker, 1972). Aktivitas inulinase ekstraseluler pada *Bacillus polymyxa* 29, *B. Polymyxa* 722, dan *B. Subtilis* 68 berkisar pada suhu antara 33- 35 °C, pada pH 7, dengan waktu inkubasi selama 72 jam (Zherebtsou, 2003).

Spektrofotometer UV-Vis merupakan alat instrumen yang dapat digunakan untuk mendeteksi adanya gula pereduksi yang dihasilkan akibat aktivitas inulinase. Fruktosa hasil hidrolisis inulin direaksikan dengan reagen DNS (*Dinitrosalisilat*) pada suhu 100°C dalam suasana basa. Reagen DNS (*Dinitrosalisilat*) saat bereaksi dengan fruktosa berubah warna dari kuning menjadi warna jingga kemerahan. Perubahan warna ini menandakan bahwa di

dalam sampel mengandung gula pereduksi. Reaksi yang terjadi merupakan reaksi redoks dimana gugus aldehid bertindak sebagai pereduksi dan DNS (*Dinitrosalisilat*) bertindak sebagai oksidator. Gugus aldehid akan teroksidasi menjadi karboksil dan DNS (*Dinitrosalisilat*) akan tereduksi menjadi asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat (Kusmiati dan Agustini, 2010).

Asam 3-amino-5-nitrosalisilat merupakan senyawa yang dapat menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang 550 nm. Jika kadar gula pereduksi didalam sampel tinggi, maka molekul 3-amino-5nitrosalisilat yang terbentuk akan semakin banyak sehingga absorbansi sampel semakin tinggi.

Berdasarkan uraian di atas, penulis tertarik untuk menentukan aktivitas optimum dan tipe aksi enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin dengan menggunakan reagen DNS yang diuji dengan menggunakan Spektronik 20D. Oleh sebab itu, penulis tertarik melakukan penelitian dengan judul "*Penentuan Aktivitas Optimum dan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin dari Bakteri Rizosfer Umbi Dahlia (Dahlia sp.)*".

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah bagaimana aktivitas optimum dan tipe aksi enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin dari bakteri rizosfer umbi dahlia (*Dahlia sp.*) ?

1.3 Batasan Masalah

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

1. Variasi suhu yang digunakan adalah 20°C; 30°C; 37°C; 40°C dan 50°C.
2. Variasi pH larutan buffer yang digunakan adalah 4,5; 5; 5,5; 6; 7 dan 8.
3. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,5 %; 1%; 1,5%; 2% dan 2,5 %.
4. Waktu inkubasi yang digunakan adalah 30 menit.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah :

1. Menentukan aktivitas optimum enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin pada variasi pH, suhu dan konsentrasi substrat dari bakteri rizosfer umbi dahlia.
2. Menentukan tipe aksi enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin dari bakteri rizosfer umbi dahlia.

1.5 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah :

1. Memberikan informasi tentang aktivitas optimum enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin dari bakteri rizosfer umbi dahlia.
2. Memberikan informasi tentang tipe aksi enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin dari bakteri rizosfer umbi dahlia.
3. Memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu pengetahuan tentang aktivitas optimum dan tipe aksi enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin dari bakteri rizosfer umbi dahlia.

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Rizosfer Umbi Dahlia

Tanaman dahlia merupakan tanaman florikultura yang termasuk kedalam familia *Compositae*. Tanaman dahlia tersusun atas umbi, batang, daun, buah, bunga dan biji. Pada umbi dahlia terkandung gula pereduksi, lemak, protein, serat, abu dan inulin. Komposisi yang terkandung dalam umbi dahlia dimuat pada Tabel 1. Inulin merupakan kandungan terbesar yang ditemukan pada umbi dahlia.

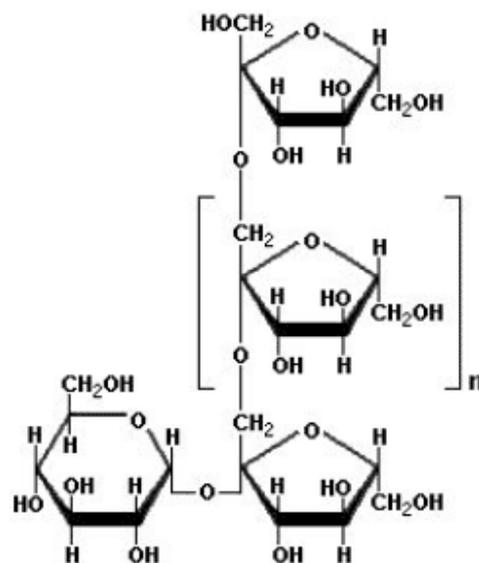
Tabel 1. Komposisi yang terkandung dalam umbi dahlia
(Saryono *et al.*, 1998)

Komposisi	Kadar (%)
Inulin	69,50 – 75,48
Gula pereduksi	4,40 – 6,60
Lemak	0,50 – 1,00
Protein	3,90 – 5,70
Serat	3,30 – 5,40
Abu	0,2 – 0,40

Pada permukaan umbi dahlia terdapat tanah yang menempel yang disebut dengan rizosfer. Tanah ini dapat ditumbuhi oleh mikroorganisme. Pada rizosfer umbi dahlia dapat ditemukan kelompok bakteri mesofil dan bakteri termofil penghidrolisis inulin. Bakteri penghidrolisis inulin mengekspresikan inulinase dengan tipe exoinulinase atau endoinulinase. Bakteri penghidrolisis inulin yang telah ditemukan adalah *Bacillus sp*, *Candida sp*, *Marinimicrobium sp*, *Nocardiopsis sp*, *Sphingobacterium sp*, *Clostridium sp* dan *Geobacillus sp* (Singh *et al.*, 2016).

2.2 Inulin

Inulin merupakan polimer alami yang tergolong karbohidrat. Monomer inulin adalah fruktosa yang jumlah pada satu untai polimernya bervariasi tergantung pada sumber inulin. Antara monomer fruktosa pada inulin dihubungkan oleh ikatan (2-1) residu β -D fruktofuranosy (Worman & Day 1983; Grupta *et al.*, 1992). Inulin yang berasal dari tumbuhan mempunyai DP yang lebih rendah daripada inulin yang berasal dari mikroorganisme. Inulin yang berasal dari tumbuhan umumnya mempunyai DP 70 unit. Inulin yang berasal dari bakteri mempunyai DP yang tinggi yaitu 10.000 sampai 100.000. Tingkat DP inulin bervariasi tergantung pada sumber tanaman, iklim, kondisi tumbuh, serta waktu penyimpanan setelah panen. Jika $2 < DP \leq 10$ dikenal dengan oligofruktosa (Kulminskaya, 2003).



Gambar 1. Struktur inulin (Franck, 2003)

Pada Gambar 1, polimer inulin ditulis dengan GF_n. G adalah unit glukosa terminal, F adalah unit fruktosa dan n adalah jumlah unit fruktosa yang ditemukan

dalam satu rantai inulin. Inulin yang mempunyai ujung terminal glukosa disebut GFn, sedangkan inulin tanpa ujung terminal glukosa disebut dengan Fn (Chi *et al.*, 2009).

Inulin merupakan bubuk granula putih yang bersifat amorf, higroskopik, tidak berbau, agak larut dalam air dan larutan organik serta sangat larut dalam air panas (Steinbuchel dan Ki Rhee, 2005). Inulin tidak larut dalam air dingin, bahkan dalam air yang bersuhu 55°C inulin hanya larut 5% (Vandamme dan Derycke, 1983). Kelarutan inulin dalam air disebabkan karena interaksi gugus hidroksi dari molekul inulin dengan air. Kelarutan inulin juga dipengaruhi oleh DP inulin. Semakin besar DP inulin maka inulin semakin sulit larut (Azhar, 2009). Berikut ini adalah gambar inulin dari umbi dahlia.



Gambar 2. Inulin dari umbi dahlia (Nora, 2015)

2.3 Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin

Enzim penghidrolisis inulin merupakan enzim ekstraseluler. Enzim ekstraseluler adalah enzim yang bekerja di luar sel. Enzim ekstraseluler dapat dipisahkan dari lingkungan luar sel dengan cara filtrasi atau sentrifugasi (Lehninger, 2004).

Enzim inulinase adalah enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa dan atau fruktooligosakarida (FOS). Enzim inulinase penghidrolisis inulin memutus ikatan glikosida pada inulin dapat terjadi pada ujung non-pereduksi dan didalam untai molekul inulin. Enzim inulinase yang memutus ikatan $\beta(2-1)$ -fructofuranosidic dari ujung terminal non pereduksi pada inulin dikenal dengan *exo-inulinase* (2,1- β -D-fructan fructohydrolase) menghasilkan fruktosa dan sedikit glukosa. Enzim inulinase yang menghidrolisis ikatan $\beta(2-1)$ -fructo furanosidic pada bagian dalam untai inulin dikenal sebagai *endoinulinase* (2,1- β -D-fructan fructanohydrolase) dan menghasilkan FOS (Arand *et al*, 2002).

Inulinase ekstraseluler dapat ditemukan pada *Bacillus polymyxa* 29, *B. Polymyxa* 722, dan *B. Subtilis* 68 berkisar pada suhu antara 33-35 °C, pada pH 7 dengan waktu inkubasi selama 72 jam (Zherebtsou, 2003). Selain itu, inulinase ekstraseluler juga dapat diproduksi dari *Bacillus sp.* dengan aktivitas tertinggi pada pH 8 dengan suhu 50 °C (Aruna, 2014), sedangkan untuk crude inulinase dari *Aspergillus niveus* mempunyai pH maksimalnya adalah 4,0 dan 4,8 dengan suhu optimum 45 °C (Maria, 2005).

2.4 Aktivitas dan Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler Penghidrolisis Inulin

a. Aktivitas Enzim Ekstraseluler

Aktivitas inulinase merupakan jumlah inulinase yang diperlukan untuk menghasilkan satu μ mol gula pereduksi per menit pada kondisi tertentu. Aktivitas inulinase meningkat menyebabkan kemurnian inulinase juga meningkat dan

konstan pada saat enzim dalam keadaan murni. Aktivitas inulinase diukur pada kondisi reaksi tertentu (Lehninger, 2004).

Aktivitas optimum inulinase yang dihasilkan oleh *Candida kefyr* adalah pada pH 4,5 dengan suhu 50 °C, pada *Aspergillus niger* adalah pada pH 4,3-4,4 dengan suhu 45-60°C (Enzyme Handbook, 1991), pada *Aspergillus niveus* adalah pada pH 4,8 dengan suhu 45°C (Maria, 2005), dan pada *Bacillus cereus* pH optimumnya adalah 7 dengan suhu 30°C dan konsentrasi substrat 1,5% (Meenekshi, 2012). Aktivitas optimum yang dihasilkan oleh inulinase ekstraseluler yang diproduksi dari *Bacillus sp.* adalah pada pH 8 dengan suhu 50°C (Aruna, 2014). Aktivitas inulinase dapat dihitung dengan menggunakan rumus di bawah :

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

Keterangan :

[X] = jumlah gula pereduksi (µg/mL)

t = waktu inkubasi (menit)

Mr Fruktosa = 180,1

b. Tipe Aksi Enzim Ekstraseluler

Enzim inulinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis inulin menjadi bentuk oligosakarida melalui aktivitas endoinulinase dan menjadi monomer fruktosa melalui aktivitas eksoinulinase. Eksoinulinase adalah inulinase yang mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan glikosida β-2,1 pada posisi terminal sehingga menghasilkan fruktosa. Endoinulinase adalah inulinase yang menghidrolisis polimer inulin pada bagian internal, sehingga menghasilkan produk berupa fruktooligosakarida (FOS) (Ruhayuningsih dan Purwanti; Widowati, 2005).

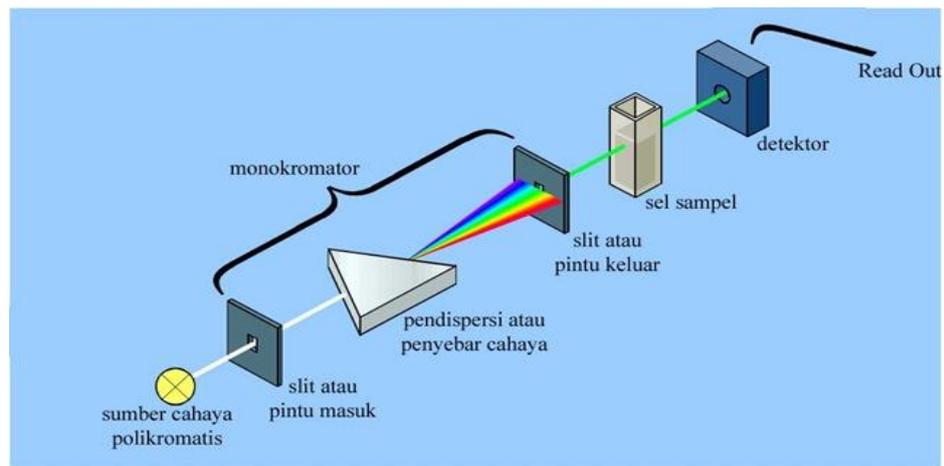
2.5 Spektrofotometer

Spektrofotometer merupakan suatu instrumen yang digunakan untuk menentukan aktivitas inulinase. Prinsip dari alat spektrofotometer adalah sinar polikromatis yang berasal dari sumber sinar akan dijejerkan oleh lensa menuju prisma dan didapat sinar monokromatis dengan beberapa panjang gelombang. Sinar monokromatis yang sesuai akan melewati celah keluar, sedangkan yang tidak sesuai akan tertahan. Sinar yang sesuai akan melewati larutan yang berwarna didalam kuvet, maka sinar tersebut akan diserap dan sebagian akan diteruskan. Sinar yang diteruskan akan ditangkap oleh detektor dan diubah menjadi signal listrik yang diperkuat oleh ampliifier kemudian diteruskan ke recorder. Pada recorder akan dilanjutkan ke galvanometer dan tertera data dalam bentuk %T atau absorban.

Spektrofotometer UV-Vis merupakan gabungan antara prinsip spektrofotometer UV dan Visible. Alat ini menggunakan dua buah sumber cahaya yang berbeda, yaitu sumber cahaya UV dan sumber cahaya Visible. Larutan yang dianalisis diukur serapan sinar ultra violet atau sinar tampaknya. Konsentrasi larutan yang dianalisis akan sebanding dengan jumlah sinar yang diserap oleh zat yang terdapat dalam larutan tersebut.

Prinsip kerja dari spektrofotometer UV-Vis mengacu pada hukum Lambert-Beer yang mana bila cahaya monokromatis melalui suatu media (larutan), maka sebagian cahaya tersebut akan diserap, sebagian dipantulkan dan sebagian lagi akan dipancarkan. Sinar dari sumber cahaya akan dibagi menjadi dua berkas oleh cermin yang berputar pada bagian dalam spektrofotometer. Berkas pertama akan

melewati kuvet berisi blanko, sementara berkas kedua akan melewati kuvet berisi sampel. Blanko dan sampel akan diperiksa secara bersamaan. Adanya blanko berguna untuk menstabilkan absorpsi akibat perubahan voltase dari sumber cahaya.



Gambar 3. Komponen alat Spektrofotometer UV – Vis
(Darmawangsa, 1999)

2.6 Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) adalah kromatografi adsorpsi yang menggunakan adsorben sebagai fasa diam dan pelarut sebagai fasa geraknya. Fasa diam yang digunakan adalah adsorben berukuran kecil dengan diameter partikel antara 10-3 μm . Jika semakin kecil ukuran partikel fasa diam, maka semakin baik kinerja KLT. Biasanya adsorben yang digunakan adalah silica gel 60 F₂₅₄. Fasa gerak yang digunakan adalah dalam bentuk campuran asam asetat, kloroform dan air dengan perbandingan (35; 30; 5 v/v/v). Marker yang digunakan adalah fruktosa sebagai pembanding terhadap sampel yang akan dianalisa dengan KLT.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) merupakan teknik yang sensitif karena sampel digunakan dalam jumlah yang sangat sedikit (μg). KLT biasanya digunakan untuk

analisis kualitatif mengukur kepekatan warna noda, menentukan jumlah komponen dalam campuran, mengidentifikasi senyawa dan memurnikan senyawa.

Kromatografi Lapis Tipis (KLT) mempunyai tiga langkah kerja yaitu menotolkan noda, menunggu terjadinya pemisahan komponen dan menghitung nilai Rf (Retention Factor) yang didapatkan. Nilai Rf dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

$$Rf = \frac{\text{Jarak perpindahan komponen}}{\text{Jarak perpindahan pelarut}}$$

Noda ditotolkan dengan menggunakan pipet mikro untuk memindahkan sebagian kecil sampel ke plat KLT. Noda ini akan meninggalkan bagian kecil pada material. Setelah noda memisah baru dilakukan analisa untuk menentukan tipe aksi inulinase (Prabhjot, dkk, 2006).

2.7 Reagen DNS (Dinitrosalisilat)

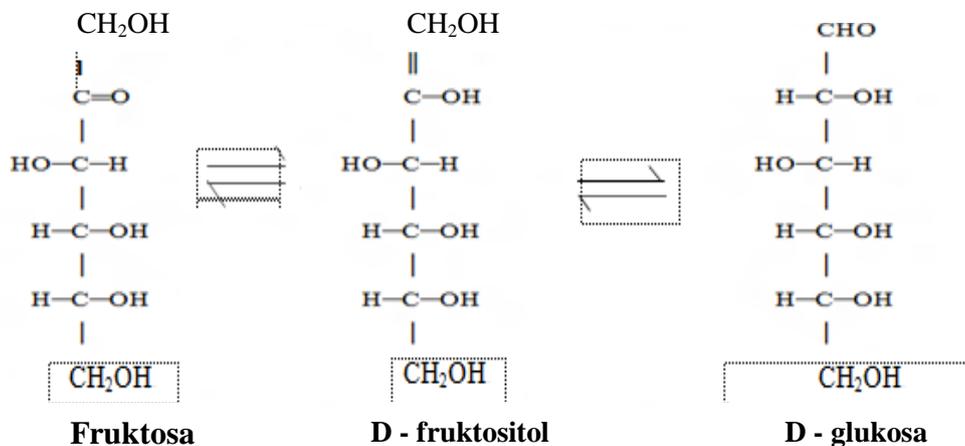
Reagen DNS adalah asam dinitro salisilat yang dapat digunakan sebagai pereaksi pada reaksi redoks dengan gula pereduksi. Reagen DNS dapat dibuat dengan melarutkan asam 3,5-dinitrosalisilat, NaOH, Na₂SO₃, Na-K-tartarat, fenol, dan aquades. Reagen DNS memiliki pH basa sehingga fruktosa mudah untuk teroksidasi karena berada pada kesetimbangan dengan dua aldehida diastereometrik serta penggunaan suatu zat antara tautomerik enadiol (Fessenden, 1982).

Reagen DNS merupakan suatu senyawa aromatis yang jika bereaksi dengan gula pereduksi akan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat. Asam 3-amino-5-nitrosalisilat nantinya dapat menyerap radiasi gelombang elektromagnetik pada panjang gelombang maksimum 550 nm. Kadar gula pereduksi yang terdapat

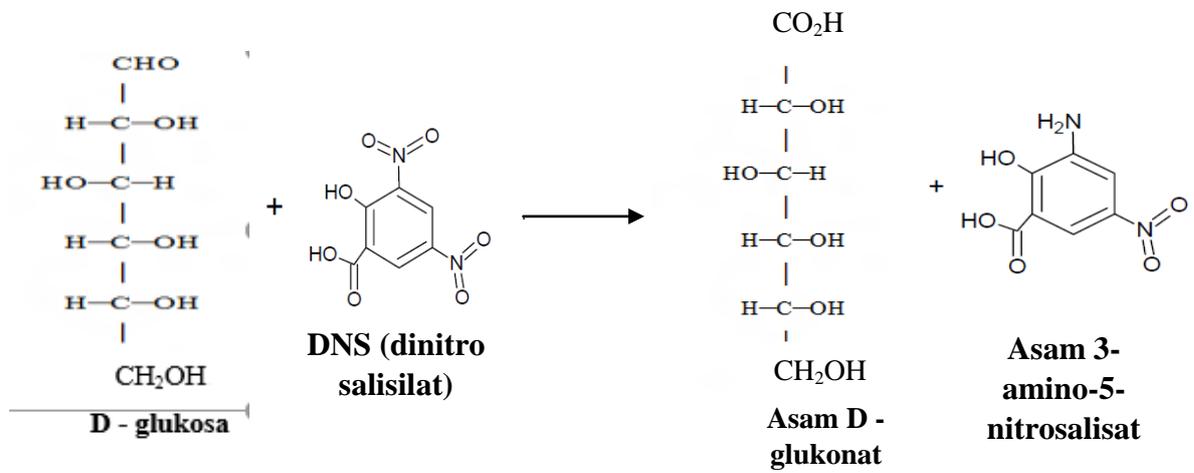
dalam sampel tinggi, maka molekul asam 3-amino-5-nitrosalisat yang terbentuk semakin banyak, sehingga mengakibatkan nilai absorbansi sampel semakin tinggi (Kusmiati dan Agustini, 2010).

Reaksi gula pereduksi dengan reagen DNS merupakan suatu reaksi redoks dimana gugus aldehyd bertindak sebagai pereduksi akan teroksidasi menjadi karboksil, sedangkan reagen DNS bertindak sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisat. Jika pada sampel terdapat gula pereduksi, maka larutan DNS akan berubah warna dari kuning menjadi warna jingga kemerahan pada suhu tertentu dalam suasana basa. Reaksi ini biasanya terjadi pada suhu yang tinggi 100°C (Kusmiati dan Agustini, 2010). Reagen DNS dapat bereaksi dengan produk inulin dapat dilihat pada gambar di bawah ini:

Tahap I tautomerik



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



Gambar 4. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS (Miloski, *et al.* 2008)

BAB V PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan tentang penentuan aktivitas optimum dan tipe aksi enzim ekstraseluler penghidrolisis inulin dari bakteri rizosfer umbi dahlia (*Dahlia sp.*) dapat disimpulkan :

1. Aktivitas optimum enzim ekstraseluler pada pH 5; suhu 37°C dengan konsentrasi substrat 2,5% (w/v).
2. Enzim ekstraseluler yang ditemukan adalah enzim ekstraseluler dengan tipe endoinulinase.

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 tipe aksi enzim ekstraseluler dengan eluen lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Arand, M., Golubev, A. M., Neto, J. R., Polikarpov, I., Wattiez, R., Korneeva, O. S. et al. (2002). *Purification, characterization, gene cloning and preliminary X-ray data of the exo-inulinase from Aspergillus awamori*. *Biochem. J.* 362, 131-135.
- 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, M. 2009. "Inulin Sebagai Prebiotik". *SAINTEK Vol. XII, Nomor 1*.
- Campbell, N.A, J.B Reece and L.G Mitchell. 2000. *Biologi Edisi Kelima Jilid I terjemahan*. Jakarta: Erlangga.
- Chi, Z. Chi, Z. Zhang, T. Liu, G. Li, J. Wang, X., *Production, characterization and gene cloning of the extraceluller enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications*. *Biotechnology Advances.* 27: 236-255 (2009).
- Darmawangsa. 1999. *Analisis instrument*. Jakarta : CV.Grayuna.
- Fessenden. 1982. *Kimia Organik Edisi ketiga Jilid 2*. Penerbit Erlangga , dicetak PT. Gelora Aksara Pratama.
- Franck, De Lenheer. 2003. *Inulin*. Email : ann.franck@orafti.com. Diakses 25 maret 2004.
- Gupta A.K., M. Kaur, N. Kaur, & R. Singh. 1992. *A comparison of properties of inulinase od Fusarium oxysporum immobilized on various supports*. *Journal Chem. Tech. Biotechnology* 53: 293-296.
- Kulminskaya, A., et al. 2003. "Biochemical characterization of Aspergillus awamori exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis". *Biochimica et Biophysica Acta* 1650 (2003) 22–29.
- Kusmiati dan Agustini N.W.S. 2010. *Pemanfaatan Limbah Onggok untuk Produksi Asam Sitrat dengan Penambahan Mineral Fe dan Mg pada Substrat Menggunakan Kapang Trichoderma Sp danAspergillus Niger*. *Seminar Nasional Biologi*, 856-866.
- Lehninger, A. L. 2004. *Dasar-dasar Biokimia Jilid 1a. b. M. T.* Jakarta : Erlangga