

**PENENTUAN AKTIVITAS DAN TIPE AKSI INULINASE DARI ISOLAT BB3
BAKTERI TERMOFILIK SUMBER AIR PANAS
BATU BAJANJANG SOLOK**

SKRIPSI

*Diajukan Kepada Tim Penguji Skripsi Jurusan Kimia
sebagai Salah Satu Syarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Sains*



Oleh

**NORA ANDRIANI
NIM. 1101515**

**PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2015**

HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

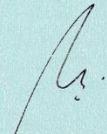
PENENTUAN AKTIVITAS DAN TIPE AKSI INULINASE DARI ISOLAT BB3
BAKTERI TERMOFILIK SUMBER AIR PANAS
BATU BAJANJANG SOLOK

Nama : NORA ANDRIANI
NIM : 1101515
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, April 2015

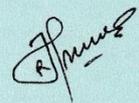
Disetujui oleh

Pembimbing I



Dr. Minda Azhar, M.Si
NIP 19641124 199112 2 001

Pembimbing II



Dra. Irvani, M.S
NIP 19620133 198603 2 001

HALAMAN PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

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

Judul : Penentuan Aktivitas dan Tipe Aksi Inulinase dari Isolat
BB3 Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Batu
Bajanjang Solok

Nama : NORA ANDRIANI

NIM : 1101515

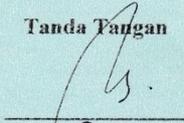
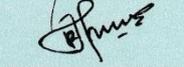
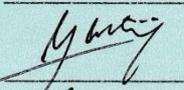
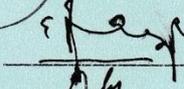
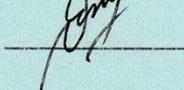
Program Studi : Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, April 2015

Tim Penguji

| | Nama | Tanda Tangan |
|---------------|------------------------------|---|
| 1. Ketua | : Dr. Minda Azhar, M.Si |  |
| 2. Sekretaris | : Dra. Iryani, M.S |  |
| 3. Anggota | : Dra. Yustini Ma'aruf, M.Si |  |
| 4. Anggota | : Edi Nasra, S.Si, M.Si |  |
| 5. Anggota | : Deski Beri, S.Si, M.Si |  |

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

Nama : Nora Andriani
NIM/TM : 1101515/2011
Prodi/Jurusan : Kimia/Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Judul Skripsi : Penentuan Aktivitas dan Tipe Aksi Inulinase dari Isolat BB3
Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Batu Bajanjang Solok

dengan ini menyatakan bahwa:

1. Karya tulis/skripsi saya ini adalah asli dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar akademik, baik di UNP maupun Perguruan Tinggi lainnya.
2. Karya tulis/skripsi saya ini murni gagasan, pemikiran dan rumusan saya serta tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis/diterbitkan orang lain kecuali sebagai acuan/kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.
3. Karya tulis/skripsi ini **sa**h setelah ditandatangani **asli** oleh Tim Pembimbing dan Tim Penguji.

Demikianlah pernyataan ini saya buat dengan sesungguhnya. Apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik berupa pencabutan gelar akademik serta sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di Perguruan Tinggi.

Padang, April 2015

Yang menyatakan,



Nora Andriani

ABSTRAK

Nora Andriani, 2015 : Penentuan Aktivitas dan Tipe Aksi Inulinase dari Isolat BB3 Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Batu Bajanjang Solok

Inulinase dari bakteri termofilik merupakan enzim yang potensial digunakan dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktooligosakarida (FOS) dan fruktosa. FOS dan fruktosa merupakan dua senyawa penting di industri pangan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas optimum inulinase pada variasi pH (4,0; 4,5; 5,0; 5,5 dan 6,0), suhu (40°C, 45°C, 50°C, 55°C dan 60°C), dan konsentrasi substrat (0,5%; 1%; 1,5%; 2% dan 2,5%) dengan waktu inkubasi 30 menit. Selain itu, juga dilakukan penentuan tipe aksi inulinase, nilai K_M dan V_{maks} . Gula pereduksi akibat aktivitas inulinase ditentukan dengan metoda Nelson-Samogyi pada λ_{maks} 640 nm. Tipe aksi ditentukan dengan metoda *Thin Layer Chromatography* (TLC), sedangkan nilai K_M dan V_{maks} ditentukan melalui persamaan Michaelis-Menten dan kurva Lineweaver-Burk. Aktivitas inulinase yang ditemukan optimum pada pH 4,5; suhu 55°C dan konsentrasi substrat 2%. Nilai K_M dan V_{maks} inulinase adalah $9,78 \times 10^{-3}$ % (w/v) dan 8×10^{-3} U/mL. Inulinase yang ditemukan termasuk tipe eksoinulinase.

Kata kunci: inulin, inulinase, aktivitas, tipe aksi, fruktosa

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis ucapkan atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi ini dapat diselesaikan sesuai waktu yang diharapkan. Salawat dan salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW, Sang idola seluruh umat yang telah berhasil membawa umat manusia ke zaman yang berilmu pengetahuan seperti saat ini.

Skripsi ini berjudul “**Penentuan Aktivitas dan Tipe Aksi Inulinase dari Isolat BB3 Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Batu Bajanjang Solok**” diajukan sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Sains. Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak. Untuk itu, penulis mengucapkan terima kasih kepada pihak-pihak terkait.

1. Ibu Dr. Minda Azhar, M.Si selaku pembimbing I yang telah membimbing penulis dan memberikan arahan pada penelitian ini.
2. Ibu Dra. Iryani, M.S selaku pembimbing II yang telah membimbing penulis dan memberikan arahan pada penelitian ini.
3. Bapak Budhi Oktavia, S.Si, M.Si, P.hD yang telah bersedia meluangkan waktu untuk membimbing penulis dalam analisis menggunakan HPLC.
4. Ibu Dr. Latisma Dj, M.Si selaku dosen Penasehat Akademik penulis yang telah memberikan saran, masukan serta dukungan.

5. Ibu Dra. Hj. Yustini Ma'aruf, M.Si; Bapak Edi Nasra, S.Si, M.Si; dan Bapak Deski Beri, S.Si, M.Si selaku dosen pembahas skripsi jurusan kimia FMIPA UNP
6. Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi Kementerian Pendidikan Nasional yang telah mendanai penelitian ini
7. Kedua orang tua penulis yang telah memberikan doa dan dukungan baik secara moril maupun materil
8. Kemudian tak lupa pula kepada pihak-pihak terkait lainnya yang menjadi sumber informasi sehingga dapat dijadikan referensi dalam penulisan skripsi ini.

Penelitian ini diharapkan dapat menyumbang informasi dan pengetahuan tentang inulinase termotabil karena sifat enzimnya yang lebih menguntungkan. Demi kesempurnaan penulisan, saya selaku penulis sangat mengharapkan kritik dan saran dari Bapak dan Ibu dosen pembahas. Semoga skripsi ini memberikan manfaat bagi pembaca umumnya dan penulis khususnya.

Padang, April 2015

Penulis

DAFTAR ISI

| | |
|---|-----------|
| ABSTRAK | i |
| KATA PENGANTAR | ii |
| DAFTAR ISI..... | iv |
| DAFTAR TABEL..... | vi |
| DAFTAR GAMBAR | vii |
| DAFTAR LAMPIRAN..... | ix |
| BAB I PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang | 1 |
| 1.2. Batasan Masalah..... | 4 |
| 1.3. Perumusan Masalah..... | 5 |
| 1.4. Tujuan Penelitian..... | 5 |
| 1.5. Manfaat Penelitian..... | 5 |
| BAB II TINJAUAN PUSTAKA..... | 6 |
| 2.1. Bakteri Termofilik dan Enzim Termostabil | 6 |
| 2.2. Inulin | 7 |
| 2.3. Struktur Inulinase | 10 |
| 2.4. Aktivitas Inulinase | 15 |
| 2.5. Aksi Inulinase | 17 |
| BAB III METODE PENELITIAN..... | 22 |
| 3.1. Jenis Penelitian..... | 22 |
| 3.2. Variabel Penelitian | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.3. Objek Penelitian | 22 |
| 3.4. Alat dan Bahan | 23 |
| 3.5. Prosedur Penelitian..... | 23 |
| BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN | 32 |
| 4.1. Deskripsi Data | 32 |
| 4.2. Analisis Data | 35 |
| 4.3. Pembahasan..... | 39 |
| BAB V PENUTUP..... | 49 |
| 5.1. Simpulan | 49 |
| 5.2. Saran..... | 49 |
| DAFTAR PUSTAKA | 50 |
| LAMPIRAN..... | 54 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| 1. Sumber inulin dan kandungannya | 10 |
| 2. Komposisi pembuatan buffer asetat pada berbagai pH..... | 24 |
| 3. Absorban larutan standar fruktosa pada λ 640 nm | 32 |
| 4. Absorban larutan standar equimolar pada λ 640 nm | 32 |
| 5. Absorban fruktosa akibat aktivitas inulinase pada variasi pH | 33 |
| 6. Absorban fruktosa akibat aktivitas inulinase pada variasi suhu | 33 |
| 7. Absorban fruktosa akibat aktivitas inulinase pada variasi konsentrasi substrat..... | 34 |
| 8. Uji aktivitas inulinase dengan substrat inulin dan sukrosa | 34 |
| 9. Aktivitas inulinase pada variasi pH | 37 |
| 10. Aktivitas inulinase pada variasi suhu | 37 |
| 11. Aktivitas inulinase pada variasi konsentrasi substrat | 38 |
| 12. Kebalikan berganda konsentrasi substrat dan laju katalisis enzim | 39 |
| 13. Volume pembuatan larutan standar fruktosa | 65 |
| 14. Volume pembuatan larutan standar equimolar | 66 |

DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|---|---------|
| 1. Pengelompokan mikroorganismen berdasarkan temperatur pertumbuhannya... | 6 |
| 2. Struktur inulin | 8 |
| 3. Inulin dari umbi dahlia | 9 |
| 4. Struktur primer inulinase dari <i>Aspergillus awamori</i> | 11 |
| 5. Posisi struktur sekunder inulinase dari <i>Aspergillus awamori</i> | 12 |
| 6. Struktur tersier inulinase dari <i>Aspergillus awamori</i> | 14 |
| 7. <i>Active site</i> inulinase dari <i>Aspergillus Awamori</i> | 15 |
| 8. Pola pemutusan ikatan glikosida pada inulin oleh inulinase..... | 17 |
| 9. Kromatogram produk hidrolisis inulin menggunakan HPLC | 19 |
| 10. Penentuan produk hidrolisis inulin akibat inulinase menggunakan TLC..... | 21 |
| 11. Panjang gelombang maksimum fruktosa | 35 |
| 12. Kurva standar larutan fruktosa..... | 36 |
| 13. Kurva standar larutan equimolar fruktosa dan glukosa | 37 |
| 14. Hubungan aktivitas enzim terhadap variasi pH | 41 |
| 15. Hubungan aktivitas enzim terhadap variasi suhu | 42 |
| 16. Hubungan aktivitas enzim terhadap variasi konsentrasi substrat | 43 |
| 17. Kurva pemetaan Lineweaver-Burk yang menggambarkan harga K_M dan V_{maks} inulinase dari isolat BB3..... | 45 |
| 18. Penentuan produk hidrolisis inulin akibat inulinase menggunakan TLC..... | 47 |
| 19. Absorban larutan standar fruktosa 100 ppm pada panjang gelombang Maksimum..... | 62 |
| 20. Kromatogram HPLC larutan standar fruktosa 500 ppm | 62 |
| | 73 |

| | |
|--|----|
| 21. Pembuatan <i>single coloni</i> isolat bakteri BB3..... | 73 |
| 22. Kultur isolat bakteri termofilik BB3 pada media cair | 74 |
| 23. Uji adanya aktivitas inulinase ekstraseluler dengan Lugol's..... | 74 |
| 24. <i>Crude</i> enzim dari isolat BB3 bakteri termofilik..... | 75 |
| 25. Deret larutan standar | 75 |
| 26. Pengendapan protein | 75 |
| 27. Reaksi gula pereduksi dengan Cu alkalis (reagen Nelson) | 76 |
| 28. Larutan hasil penentuan aktivitas inulinase | |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|---------|
| 1. Ekstraksi <i>crude</i> enzim..... | 54 |
| 2. Penentuan absorban larutan standar fruktosa | 55 |
| 3. Penentuan absorban larutan standar equimolar | 56 |
| 4. Penentuan aktivitas inulinase pada variasi pH | 57 |
| 5. Penentuan aktivitas inulinase pada variasi suhu | 58 |
| 6. Penentuan aktivitas inulinase pada variasi konsentrasi substrat..... | 59 |
| 7. Penentuan tipe aksi inulinase dengan HPLC | 60 |
| 8. Penentuan tipe aksi inulinase dengan TLC | 61 |
| 9. Data pengukuran dengan spektrofotometer UV-Vis dan HPLC | 62 |
| 10.Perhitungan | 63 |
| 11.Dokumentasi hasil penelitian | 73 |

BAB I

PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Pemanfaatan enzim di berbagai industri semakin berkembang, baik industri pangan maupun industri nonpangan. Inulinase merupakan salah satu enzim yang dimanfaatkan di industri pangan. Enzim ini mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktooligosakarida (FOS) dan fruktosa. Hidrolisis inulin juga dapat dilakukan dengan menggunakan asam yaitu pada pH 1-2 dan suhu 80-100°C. Namun metoda ini jarang digunakan. Selain biayanya yang mahal, fruktosa yang dihasilkan akan membentuk fraksi difruktosa anhidrat yang berwarna coklat dan rasa yang tidak manis. Oleh karena itu, hidrolisis inulin secara enzimatik lebih sering digunakan karena mampu menghasilkan produk yang lebih jernih dan lebih manis (Allais *et al*, 1986). Fruktosa yang dihasilkan dari hidrolisis inulin menggunakan inulinase mencapai 98% (Zittan, 2006).

Berdasarkan aksinya, inulinase terbagi menjadi dua jenis yaitu eksoinulinase dan endoinulinase. Eksoinulinase mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada unit fruktosa terminal dari ujung nonpereduksi sehingga menghasilkan fruktosa. Di samping itu, endoinulinase mengkatalisis reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada bagian internal dari molekul inulin untuk menghasilkan FOS sebagai produk utamanya.

Produk biokonversi inulin dengan bantuan inulinase ini memiliki manfaat yang sangat besar di industri pangan. Salah satu manfaatnya adalah sebagai bahan pemanis pengganti sukrosa dalam pembuatan sirup fruktosa (Rukmana, 2000). Sirup fruktosa atau *high fructose syrup* merupakan produk dengan kalori yang rendah sehingga aman dikonsumsi oleh penderita diabetes. Sirup fruktosa diketahui tidak menyebabkan toksisitas, karsinogenitas dan mortalitas (Park dan Yun, 2001). Selain itu (FOS) juga merupakan komposisi penting di industri makanan dan farmasi (Singh dan Gill, 2006). FOS dipandang sebagai prebiotik yang berperan secara selektif dalam menstimulasi pertumbuhan mikroflora yang menguntungkan sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen di usus (Lunggani dkk, 2010).

Inulinase dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur dan tumbuh-tumbuhan (Saryono, 2008). Bakteri penghasil inulinase misalnya, *Arthrobacter sp*, *Flavobacterium sp* dan *Bacillus sp*. Jamur penghasil inulinase ialah *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, dan *Chrysosporium sp*, sedangkan tumbuhan penghasil inulinase ialah *Jerusalem Artichoke*, *Chicory* dan dahlia. Selain itu, inulinase juga dapat dihasilkan oleh golongan khamir (*yeast*) seperti *Kluyveromyces sp*, *Candida sp*, *Debaromyces* dan *Saccharomyces sp* (Allais *et al*, 1986; Xiao *et al*, 1989; Susilowati, 2013).

Inulinase sebagaimana enzim lainnya dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, dan konsentrasi substrat. Inulinase dapat bekerja secara optimum pada suhu yang bervariasi tergantung asal inulinase tersebut. Inulinase dari *Aspergillus niger*, yaitu sejenis kapang yang diisolasi dari umbi

dahlia memiliki suhu optimum 45°C dan pH optimum 4,6 (Saryono, 2008). Inulinase dari khamir yang diisolasi dari rhizosfere umbi dahlia dan *Kluyveromyces marxianus* memiliki aktivitas dan kestabilan yang cukup tinggi yaitu pada suhu 50°C (Lungani dkk, 2010; Jain *et al*, 2012). Inulinase dari *Aspergillus niger* memiliki aktivitas optimum pada pH 5,0 (Skowronek dan Fiedurek, 2006). Meenakshi *et al* (2013), melaporkan bahwa inulinase yang diisolasi dari *Bacillus cereus* memiliki aktivitas optimum dengan konsentrasi substrat 1,5 %.

Inulinase termostabil adalah inulinase yang memiliki kestabilan pada suhu tinggi dan biasanya dihasilkan oleh bakteri termofilik. Bakteri termofilik secara umum dapat diartikan sebagai bakteri yang mampu hidup pada suhu 40 hingga 70°C. Inulinase termostabil akan lebih menguntungkan karena dapat digunakan pada suhu tinggi tanpa adanya kekhawatiran terjadinya denaturasi ataupun kontaminasi oleh mikrobia lainnya (Wijanarka dan Pujiyanto, 2002). Dong lu, *et al* (2014) telah berhasil mengisolasi inulinase termostabil dari bakteri *Nocardiopsis sp* yang diperoleh dari sedimen laut Jiaozhou Bay, China, yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 60°C.

Indonesia hingga saat ini hanya bergantung pada inulinase yang diimpor dari luar negeri padahal Indonesia merupakan negara tropis yang kaya akan sumber daya alam termasuk bakteri yang cukup potensial untuk menghasilkan inulinase (Saryono, 2008). Bakteri diketahui sebagai penghasil enzim yang lebih potensial karena pertumbuhannya yang relatif cepat. Daerah

ekstrim seperti sumber air panas merupakan salah satu tempat yang berpotensi untuk menghasilkan bakteri termofilik.

Bakteri termofilik pendegradasi inulin dari sumber air panas telah ditemukan di beberapa tempat di Sumatera Barat. Bakteri termofilik yang ditemukan dari sumber air panas Padang Balimbiang di daerah Solok telah diidentifikasi secara molekuler dan diketahui sebagai *Bacillus subtilis*. Bakteri termofilik ini dapat hidup sampai suhu 60°C (Azhar, 2011). Bakteri termofilik jenis yang sama juga ditemukan dari sumber air panas Rimbo Panti yang dapat hidup pada suhu 50°C. Selanjutnya, bakteri termofilik jenis *Bacillus licheniformis* ditemukan dari sumber air panas Bukik Kili, Solok. Bakteri ini dapat hidup dari suhu 23-60°C (Azhar, 2013). Bakteri termofilik sumber air panas Batu Bajanjang, Solok telah ditemukan tetapi aktivitas dan tipe aksi inulinase belum pernah dilaporkan sebelumnya.

1.2. Batasan Masalah

Aktivitas inulinase dipengaruhi oleh beberapa faktor seperti suhu, pH, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi. Pada penelitian ini, keempat faktor di atas dibatasi pada hal-hal berikut.

- a. Variasi suhu yang digunakan ialah 40, 45, 50, 55, dan 60 °C
- b. Variasi pH larutan yang digunakan ialah 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; dan 6,0
- c. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan ialah 0,5; 1; 1,5; 2; dan 2,5 % (w/v)
- d. Waktu inkubasi ialah selama 30 menit.

1.3. Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah yang telah diuraikan, maka dapat dirumuskan masalah penelitian ini yaitu bagaimana aktivitas optimum dan tipe aksi inulinase dari isolat BB3 bakteri termofilik yang diperoleh dari sumber air panas Batu Bajanjang Solok?

1.4. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini ialah:

- a. Menentukan aktivitas optimum inulinase dari isolat BB3 bakteri termofilik sumber air panas Batu Bajanjang pada variasi pH, suhu dan konsentrasi substrat.
- b. Menentukan K_M dan V_{maks} inulinase dari isolat BB3 bakteri termofilik sumber air panas Batu Bajanjang.
- c. Menentukan tipe aksi inulinase dari isolat BB3 bakteri termofilik sumber air panas Batu Bajanjang.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini ialah:

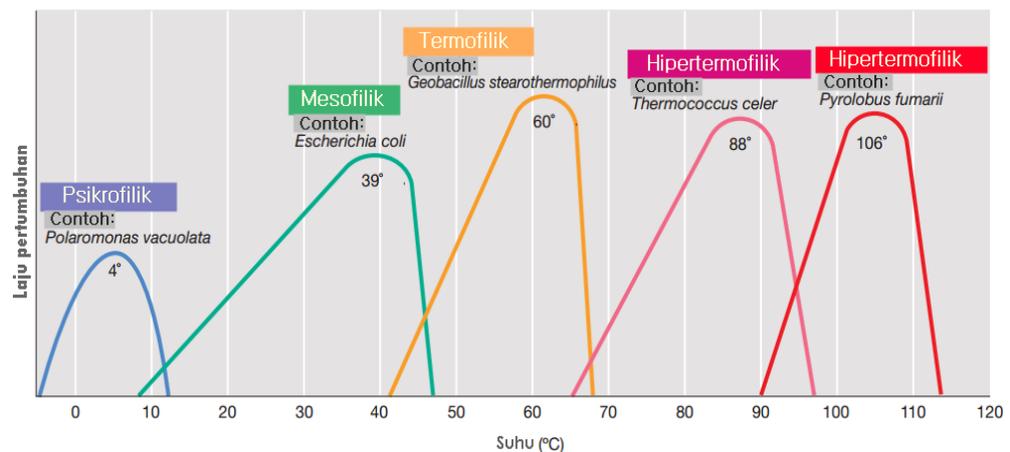
- a. Memperoleh isolat bakteri termofilik yang berpotensi menghasilkan inulinase termostabil.
- b. Memberikan informasi tentang aktivitas optimum dan tipe aksi inulinase dari isolat BB3 bakteri termofilik sumber air panas Batu Bajanjang.
- c. Memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu dan teknologi tentang aktivitas optimum dan tipe aksi inulinase dari bakteri termofilik sumber air panas.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Bakteri Termofilik dan Enzim Termostabil

Suhu merupakan salah satu faktor lingkungan yang mempengaruhi pertumbuhan mikroorganisme. Berdasarkan suhu optimum pertumbuhannya, mikroorganisme dikelompokkan menjadi mikroorganisme psikrofilik, mesofilik, termofilik dan hipertermofilik. Secara umum, rentangan suhu pertumbuhan mikroorganisme tersebut dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengelompokan mikroorganisme berdasarkan suhu Pertumbuhannya (Madigan *et al*, 2011).

Mikroorganisme yang hidup optimum pada suhu tinggi dikenal sebagai mikroorganisme termofilik atau hipertermofilik. Mikroorganisme termofilik diartikan sebagai mikroorganisme yang dapat hidup dari suhu 40-70°C dan hipertemofilik melebihi suhu 70°C (Madigan *et al*, 2011). Mikroorganisme

yang hidup pada suhu tinggi ini berpotensi menghasilkan enzim yang tahan pada suhu panas atau yang lebih dikenal dengan enzim termostabil.

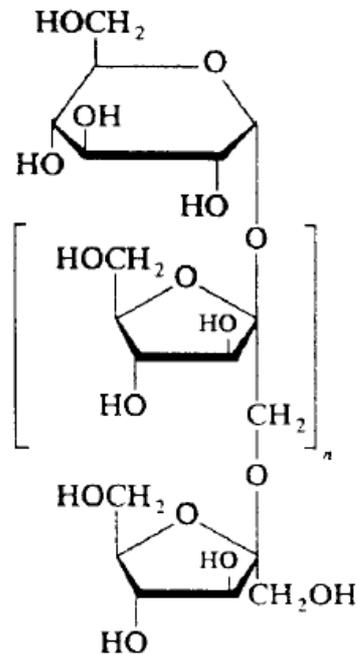
Beberapa peneliti telah berhasil mengekstrak enzim termostabil dari bakteri termofilik. Bisht (2011), mengekstrak lipase termostabil dari isolat AK-P2 bakteri termofilik sumber air panas Taptapani, India dengan suhu air mencapai 50-55°C. *Crude* enzim yang diekstrak dari bakteri *Brevibacillus borstelensis* tersebut memiliki aktivitas optimum pada suhu 60°C. Selanjutnya, Arasaratnam dan Thayaanathan (2014), mengekstrak α -amilase termostabil dari bakteri *Bacillus sp.* yang diambil dari air rebusan beras (air tajin) memiliki aktivitas optimum pada suhu 85°C dan masih dapat beraktivitas pada suhu 95°C.

Bakteri termofilik pendegradasi inulin dari sumber air panas telah ditemukan di beberapa tempat di Sumatera Barat. Bakteri termofilik *Bacillus subtilis* yang ditemukan dari sumber air panas Padang Balimbiang, Solok dapat hidup sampai suhu 60°C (Azhar dkk, 2011). Bakteri termofilik jenis yang sama juga ditemukan dari sumber air panas Rimbo Panti yang dapat hidup pada suhu 50°C. Selanjutnya, *Bacillus licheniformis* ditemukan dari sumber air panas Bukik Kili, Solok yang dapat hidup dari suhu 23-60°C (Azhar dkk, 2013).

2.2. Inulin

Inulin merupakan suatu polisakarida kedua yang berlimpah di alam setelah pati. Hidrolisis inulin menghasilkan unit-unit lebih kecil yang terdiri dari fruktooligosakarida (FOS) dan fruktosa. Monomer fruktosa yang satu

dengan yang lainnya dihubungkan oleh ikatan β -2,1 fruktofuranosida. Inulin juga dikenal dengan sebutan polifruktan karena terdiri dari monomer fruktosa dengan derajat polimerisasi (DP) yang bervariasi, tergantung pada sumber inulin tersebut. Derajat polimerisasi adalah jumlah unit monomer pada suatu rantai polimer atau oligomer. Polimer inulin dapat ditulis GF_n yaitu fruktan yang mengikat glukosa pada setiap ujung pereduksi atau Fn yaitu fruktan tanpa glukosa pada ujung pereduksinya. Simbol n pada rumus menunjukkan derajat polimerisasi. Inulin yang bersumber dari *chicory* memiliki $2 < DP \leq 60$, sedangkan fruktooligosakarida memiliki $2 < DP \leq 7$ (Menne *et al*, 2000). Struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur inulin
(Franck dan Leenheer, 2005).

Inulin berbentuk serbuk putih dan mudah larut dalam air panas, namun sukar larut dalam air dingin dan pelarut organik seperti etanol (Bergner, 2004). Dengan demikian ekstraksi inulin dapat dilakukan sesuai prinsip kelarutannya dalam air. Inulin diekstrak dari tumbuhan dengan menggunakan air panas, kemudian inulin dan air dapat dipisahkan dengan menurunkan temperaturnya. Serbuk inulin dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Inulin dari umbi dahlia

Inulin dapat digunakan sebagai bahan pemanis dan produk medis seperti obat-obatan (Akhgari *et al*, 2011). Inulin dimanfaatkan dalam bidang medis atau farmasi karena dapat mengurangi risiko kanker usus dan dapat menormalkan kadar gula darah bagi penderita diabetes melitus (Franck, 2005). Selain itu inulin tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan manusia tetapi bermanfaat sebagai prebiotik yang dapat menstimulasi pertumbuhan bakteri baik di usus (Pandiyan *et al*, 2012).

Inulin dapat diekstrak dalam jumlah yang besar dari tumbuhan *Jerusalem artichoke*, akar *chicory*, dan umbi tumbuhan dahlia. Tumbuhan *Jerusalem*

artichoke dan *chicory* tumbuh dengan baik di Amerika Utara, sedangkan tanaman dahlia tumbuh subur di dataran tinggi Indonesia. Selain tumbuhan tersebut, inulin dalam jumlah yang sedikit juga ditemukan pada bawang merah, bawang putih, bawang perai, pisang dan gandum. Kandungan inulin pada berbagai tanaman dimuat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sumber Inulin dan Kandungannya

| Sumber | Bagian yang dimanfaatkan | Kandungan inulin (%berat segar) |
|---------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Bawang merah | Umbi | 2-6 |
| Jerusalem artichoke | Umbi | 14-19 |
| Chicory | Akar | 15-20 |
| Daun bawang | Umbi | 3-10 |
| Bawang putih | Umbi | 9-16 |
| Artichoke | Daun | 3-10 |
| Pisang | Buah | 0,3-0,7 |
| Gandum | Sereal | 0,5-1* |
| Barley | Sereal | 0,5-1,5* |
| Dandelion | Daun | 12-15 |
| Burdock | Akar | 3,5-4 |
| Camas | Umbi | 12-22 |
| Murnong | Akar | 8-13 |
| Yacon | Akar | 3-19 |
| Salsify | Akar | 4-11 |

Keterangan: * : nilai selalu berubah (Frank dan Leenheer, 2005).

2.3. Struktur Inulinase

Inulinase memiliki tiga tingkatan struktur, yaitu struktur primer, struktur sekunder dan struktur tersier.

a. Struktur Primer

Struktur primer merupakan urutan-urutan residu asam amino yang tersusun pada suatu polipeptida. Struktur ini terbentuk melalui ikatan kovalen antara gugus α -amina pada residu asam amino yang satu dengan gugus α -karboksil pada residu asam amino yang berada di sebelahnya.

Ikatan tersebut dinamakan ikatan peptida atau ikatan amida. Pada basis data *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org/pdb>), struktur primer ditulis seperti tatanan huruf, dimana setiap huruf merupakan kode residu asam amino. Gambar 4 merupakan struktur primer inulinase dari *Aspergillus awamori* yang memiliki 518 residu asam amino.

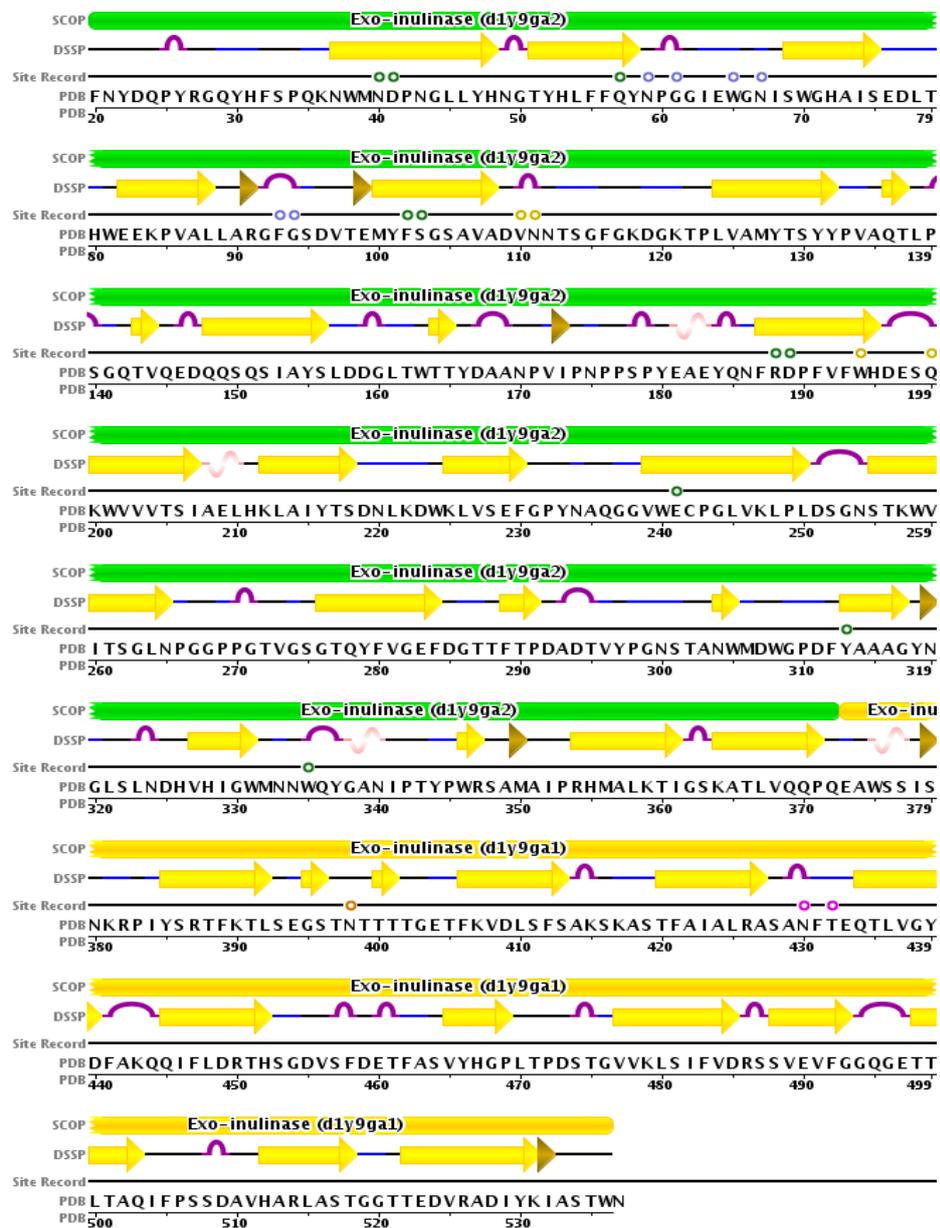
| | | | | | | |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | FNYDQPYRGQ | YHFSPQKNWM | NDPNGLLYHN | GTYHLFFQYN | PGGIEWGNIS | WGHAISEDLT |
| 61 | HWEEKPVALL | ARGFGSDVTE | MYFSGSAVAD | VNNTSGFGKD | GKTPLVAMYT | SYYPVAQTLF |
| 121 | SGQTVQEDQQ | SQSIAYSLDD | GLTWTTYDAA | NPVIPNPPSP | YEAEYQNFDR | PFVFWHDESQ |
| 181 | KWVVVTSIAE | LHKLAIYTS | NLKDWKLVS | FGPYNAQGGV | WECPLVKLP | LDSGNSTKVV |
| 241 | ITSGLNPGGP | PGTVGSGTQY | FVGEFDGTTF | TPDADTVYPG | NSTANWMDWG | PDFYAAAGYN |
| 301 | GLSLNDHVHI | GWMNNWQYGA | NIPTYPWRS | MAIPRHMALK | TIGSKATLVQ | QPQEAWSSIS |
| 361 | NKRPIYSRTF | KTLSEGSTNT | TTTGETFKVD | LSFSAKSKAS | TFAIALRASA | NFTEQTLVGY |
| 421 | DFAKQQIFLD | RTHSGDVSFD | ETFASVYHGP | LTPDSTGVVK | LSIFVDRSSV | EVFGGQGETT |
| 481 | LTAQIFPSSD | AVHARLASTG | GTTEDVRADI | YKIASTWN | | |

Gambar 4. Struktur primer inulinase dari *Aspergillus awamori* (kode PDB: 1Y4W)

b. Struktur Sekunder

Struktur sekunder terbentuk karena adanya ikatan hidrogen antara gugus $=CO$ dan $-NH$ di sepanjang tulang belakang polipeptida. Contoh struktur sekunder adalah α -heliks dan β -sheet. Struktur α -heliks terbentuk karena adanya ikatan hidrogen antara atom O (gugus $=CO$) dengan atom H (gugus $-NH$) pada ikatan peptida di sepanjang rantai polipeptida. Struktur sekunder β -sheet terbentuk melalui ikatan hidrogen antara atom O (gugus $=CO$) dengan atom H (gugus $-NH$) pada ikatan peptida lain dalam rantai peptida yang tidak sama. β -sheet ditemukan dua macam bentuk, yakni antiparalel dan paralel. Keduanya berbeda dalam hal pola ikatan hidrogennya.

Struktur sekunder inulinase dari *Aspergillus awamori* umumnya berbentuk β -sheet dan β -turn, sebagian kecil berbentuk α -heliks. Posisi struktur sekunder inulinase dimuat pada Gambar 5. SCOP hijau dan kuning masing-masing menunjukkan residu pada domain yang terdiri dari 353 residu β -Propeller dan 165 residu β -Sandwich.



Gambar 5. Posisi struktur sekunder inulinase dari *Aspergillus awamori* (Kode PDB: 1Y9G).

Pada Gambar 5 ini, β -sheet dimulai dari residu asam amino bernomor 37-48, 51-58, 69-75, 82-88, 100-108, 124-132, 136-137, 143-144, 148-156, 164-165, 187-195, 200-207, 212-218, 225-230, 239-250, 255-265, 276-284, 289-291, 304-305, 313-317, 327-331, 346-347, 354-361, 364-371, 385-392, 395-396, 400-401, 406-413, 420-427, 434-440, 445-452, 465-469, 477-485, 488-493, 498-503, 512-518 dan 522-531. β -turn dimulai pada residu asam amino dengan nomor 25-26, 49-50, 60-61, 92-93, 110-111, 139-140, 146-147, 159-160, 167-169, 178-179, 184-185, 196-199, 251-254, 270-271, 293-295, 323-324, 335-337, 362-363, 414-415, 429-430, 441-444, 457-458, 460-461, 474-475, 486-488, 494-497, dan 508-509. Selanjutnya α -heliks dimulai pada residu asam amino nomor 181-183, 208-210, 338-340 dan 375-377.

c. Struktur Tersier

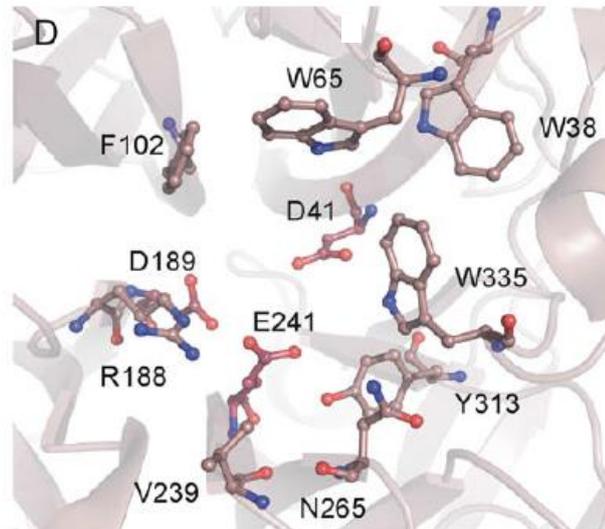
Struktur tersier terjadi karena pelipatan struktur sekunder akibat adanya interaksi gugus rantai samping residu asam amino, yaitu interaksi hidrofobik, ionik, ikatan hidrogen, gaya dispersi van der Waals dan jembatan disulfida sehingga membentuk struktur tiga dimensi. Struktur tersier inulinase dari *Aspergillus awamori* dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Struktur tersier inulinase dari *Aspergillus awamori* (Kode PDB: 1Y9G).

Active site atau yang lebih dikenal sebagai sisi aktif enzim adalah bagian dari molekul enzim yang berikatan dengan substrat untuk membentuk kompleks enzim substrat dan selanjutnya membentuk produk. *Active site* memiliki peranan sangat penting dan terlibat secara langsung dalam reaksi enzimatik. Enzim dengan jenis yang sama dapat memiliki *active site* berbeda tergantung asal enzim tersebut. *Active site* inulinase dari *Bacillus stearothermophilus* adalah residu Asp24 dan Glu203, sedangkan *active site* inulinase dari *Aspergillus awamori* adalah residu Asp41 dan Glu241. Asp dan Glu merupakan singkatan dari asam amino, yaitu asam aspartat dan asam glutamat, sedangkan angka di belakangnya menunjukkan urutan residu asam amino tersebut. Asp dan Glu masing-masingnya bertindak sebagai katalitik

nukleofil dan katalitik donor proton (<http://www.cazy.org>). *Active site* inulinase dari *Aspergillus awamori* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. *Active site* inulinase dari *Aspergillus Awamori* (Lammens *et al*, 2009).

2.4. Aktivitas Inulinase

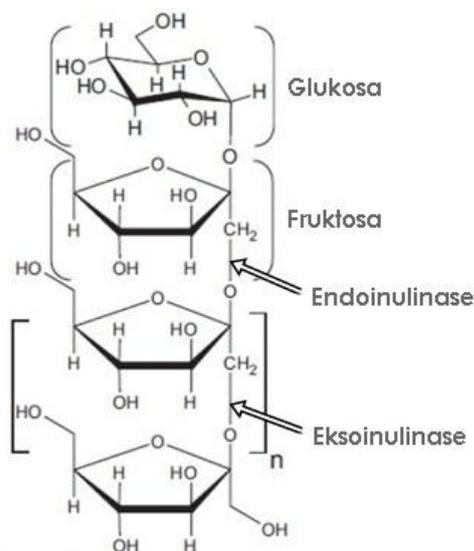
Inulinase (EC.3.2.1.7 atau EC.3.2.1.80) adalah enzim hidrolase yang mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi unit-unit lebih kecil seperti fruktooligosakarida (FOS) dan fruktosa. Kemampuan katalitik inulinase dapat ditentukan melalui aktivitas inulinase. Aktivitas inulinase didefinisikan sebagai jumlah inulinase yang diperlukan untuk menghasilkan satu μmol gula pereduksi permenit pada kondisi tertentu. Meningkatnya kemurnian inulinase menyebabkan meningkatnya aktivitas inulinase hingga mencapai aktivitas maksimum, kemudian menjadi konstan saat enzim berada dalam keadaan murni. Hal ini tentunya diukur pada kondisi reaksi yang sama (Lehninger, 2004: 249).

Aktivitas inulinase dipengaruhi oleh beberapa faktor, seperti suhu, pH, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi. Aktivitas ini bervariasi tergantung asal inulinase tersebut. Saryono (2008), mengisolasi inulinase ekstraselular dari *Aspergillus niger* yang memiliki aktivitas optimum pada suhu 45°C; pH 4,6; dengan waktu inkubasi selama 15 jam, sedangkan Dong Lu (2014) telah berhasil mengisolasi eksoinulinase yang termostabil dari bakteri *Nocardiopsis sp* yang diperoleh dari sedimen laut Jiaozhou Bay, China, dengan aktivitas optimum pada suhu 60°C; pH 8,0; waktu inkubasi selama 1 jam dan memiliki aktivitas 25,1 U/mL. Data terakhir memperlihatkan bahwa kerja enzim tersebut cepat dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa sehingga dapat diaplikasikan dalam bioteknologi dan industri.

Aktivitas inulinase dapat ditentukan dengan bantuan spektrofotometer UV-Vis. Salah satu metoda yang digunakan ialah metoda Nelson-Samogyi, yaitu metoda yang digunakan untuk mendeteksi adanya gula pereduksi. Metoda ini melibatkan dua tahap reaksi. Pada tahap pertama, ion Cu^{2+} direduksi menjadi ion Cu^+ oleh gula pereduksi. Di tahap selanjutnya ion Cu^+ dioksidasi kembali menjadi Cu^{2+} oleh pereaksi arsenomolibdat sehingga menghasilkan kompleks *molybdenum blue* yang absorbannya dapat terbaca pada panjang gelombang 520 nm (Farnet *et al*, 2010). Absorbansi sinar monokromatis dari spektrofotometer UV-Vis oleh larutan berwarna sebanding dengan jumlah gula pereduksi, sehingga nilai absorbansi yang besar menunjukkan aktivitas inulinase yang baik (Vogel, 1990).

2.5. Aksi Inulinase

Berdasarkan aksinya, inulinase terbagi menjadi dua jenis yaitu eksoinulinase dan endoinulinase. Eksoinulinase memutus ikatan β -2,1 glikosida dari ujung nonpereduksi secara berurutan sehingga menghasilkan fruktosa, sementara endoinulinase memutus ikatan β -2,1 glikosida pada bagian internal secara acak pada inulin sehingga menghasilkan FOS sebagai produk utamanya. Pemutusan ikatan glikosida pada inulin oleh inulinase dapat dilihat pada Gambar 8.

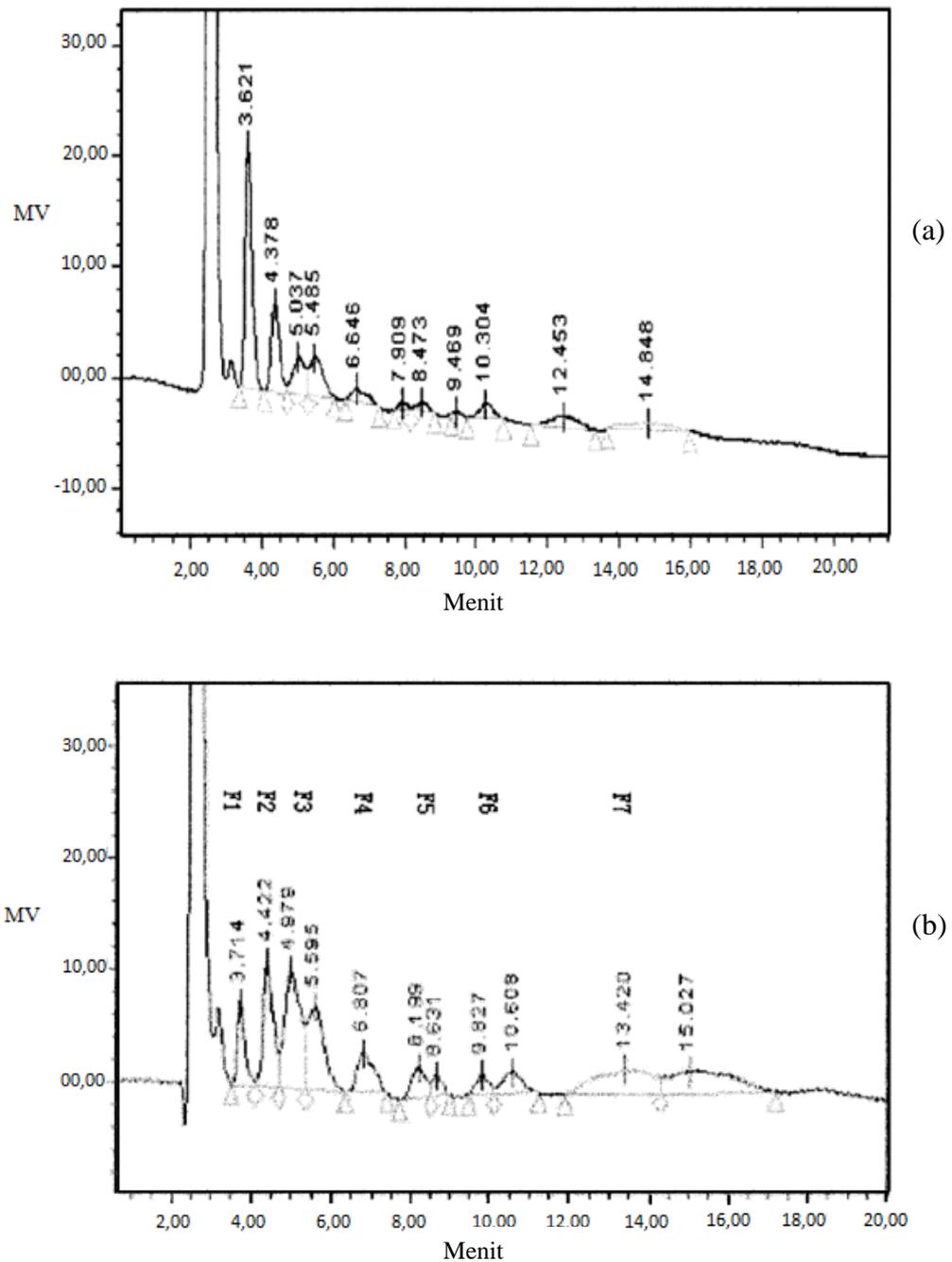


Gambar 8. Pola pemutusan ikatan glikosida pada inulin oleh inulinase (Singh dan Singh, 2010)

Tipe aksi inulinase dapat ditentukan dengan kromatografi, yaitu kromatografi cair kinerja tinggi atau *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) maupun *Thin Layer Chromatography* (TLC). HPLC dikenal sebagai peralatan yang lebih sensitif, cepat dan akurat karena menggunakan detektor yang sangat peka dalam menganalisis larutan. HPLC merupakan alternatif paling bagus untuk pemisahan zat cair. Selain disertai tekanan tinggi

dalam meningkatkan laju alir eluen, kromatografi ini tidak dipengaruhi oleh volatilitas dan stabilitas bahan sehingga cocok untuk senyawa dengan berat molekul tinggi, senyawa yang tidak stabil secara termal dan senyawa ion dengan tekanan uap yang rendah (Pecksok *et al*, 1976: 54&60).

Tipe aksi inulinase dapat diketahui dengan membandingkan waktu retensi antara gula pereduksi produk hidrolisis inulin dan larutan standar gula pereduksi yang disediakan (larutan standar fruktosa dan FOS). Waktu retensi adalah waktu antara injeksi sampel hingga proses akhir pada kromatografi. Masing-masing analit memiliki waktu retensi yang berbeda. Cruz, *et al* (1998), telah melaporkan tipe aksi inulinase dari *Aspergillus niger* dalam mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin dari beberapa sumber yang berbeda menggunakan HPLC pada laju alir 2 mL/menit dengan asetonitril-air (80:20) sebagai fasa geraknya. Selanjutnya Jing, *et al* (2003), juga telah mengidentifikasi tipe aksi inulinase dengan HPLC menggunakan asetonitril-air (7:3) sebagai fasa geraknya. Inulinase yang diperolehnya dari *Aspergillus ficuum* merupakan campuran dari endoinulinase dan eksoinulinase yang kemudian dipisahkan dengan *native polyacrylamide gel electrophoresis*. Hasil pemisahan tersebut diteliti lebih lanjut untuk mengetahui tipe aksi inulinase dengan mendeteksi produk hidrolisis inulin menggunakan HPLC. Analisis dilakukan dengan menggunakan kolom APS Hypersil (4,6 x 100 mm) dan detektor Waters 2401 RI sehingga didapatkan kromatogram seperti yang terlihat pada Gambar 9.

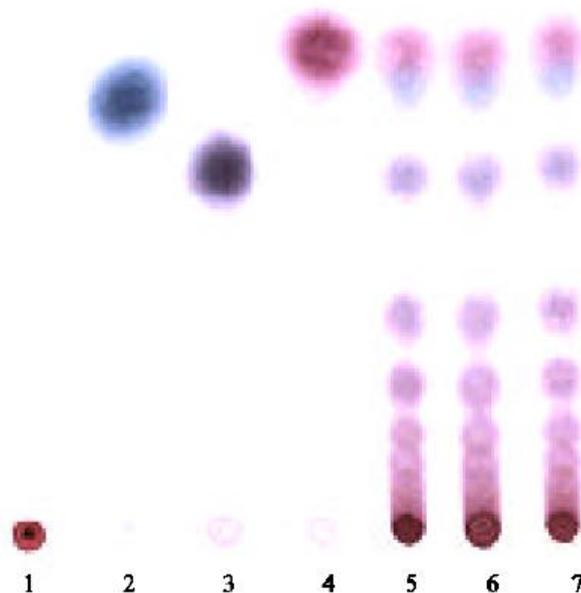


Gambar 9. Kromatogram produk hidrolisis inulin oleh (a) eksoinulinase dan (b) endoinulinase menggunakan HPLC (Jing *et al*, 2003).

Pada gambar (9a), terlihat bahwa puncak kromatogram dengan waktu retensi 3,5 sampai 4 menit didominasi oleh fruktosa sebagai produk hidrolisis inulin oleh inulinase. Hal ini menunjukkan bahwa inulinase yang bekerja adalah inulinase

yang bertipe ekso-. Selanjutnya, pada gambar (b), puncak fruktooligosakarida terlihat lebih jelas sehingga adanya endoinulinase dapat dikenali. Pada beberapa puncak dengan jumlah DP yang sama memiliki dua puncak. Ini disebabkan adanya dua jenis sakarida dengan DP yang sama, yaitu F_n dan GF_{n-1} .

Selain HPLC, penentuan tipe aksi inulinase juga dapat dilakukan dengan menggunakan TLC. Kromatografi ini digunakan karena dapat memisahkan senyawa organik seperti karbohidrat, asam amino, peptida, protein, lipid, steroid, karotenoid, kuinon sederhana (Bintang, 2010 : 142). Penentuan tipe aksi inulinase menggunakan TLC telah dilakukan oleh beberapa peneliti seperti Ertan *et al* (2005), Goosen *et al* (2008), Skowronek dan Fiedurek (2005). Meskipun analisisnya tidak secepat HPLC, TLC juga memiliki kelebihan seperti peralatannya yang lebih sederhana dan biayanya lebih murah. Tipe aksi inulinase dapat diketahui dengan membandingkan R_f (*Retardation factor*) produk hidrolisis inulin dengan standar yang disediakan. R_f merupakan perbandingan antara jarak tempuh komponen dengan jarak tempuh eluen. Hal ini dikarenakan suatu senyawa memiliki nilai R_f tertentu dalam fasa diam dan eluen sehingga terjadi pemisahan. Penentuan tipe aksi inulinase menggunakan TLC dapat dilihat pada Gambar 10.



Gambar 10. Penentuan produk hidrolisis inulin akibat inulinase (Ertan *et al* , 2005).

Gambar 10 memperlihatkan bahwa inulinase yang diidentifikasi bertipe endo karena produk hidrolisis inulin dengan waktu diinkubasi 15 menit (5), 30 menit (6) dan 60 menit (7) adalah fruktooligosakarida. Hal ini dapat dilihat dengan membandingkan jarak tempuh noda produk hidrolisis inulin dengan jarak tempuh noda standar. Standar yang digunakan pada Gambar 10 ialah inulin (1), glukosa (2), sukrosa (3) dan fruktosa (4). Jika inulinase yang digunakan bertipe ekso, maka produk yang dihasilkan hanya fruktosa sehingga noda yang muncul adalah sesuai dengan jarak tempuh noda fruktosa standar, namun pada produk hidrolisis inulin ini terdiri atas beberapa noda (komponen 5, 6, dan 7) yang merupakan noda fruktooligosakarida.

BAB V

PENUTUP

5.1. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang penentuan aktivitas dan tipe aksi inulinase dari isolat BB3 bakteri termofilik sumber air panas dapat disimpulkan

1. Aktivitas inulinase optimum pada pH 4,5; suhu 55°C dan konsentrasi substrat 2% (w/v).
2. Harga K_M dan V_{maks} inulinase adalah $9,78 \times 10^{-3}$ % (w/v) dan 8×10^{-3} U/mL.
3. Inulinase yang ditemukan adalah inulinase yang bertipe ekso-.

5.2. Saran

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

- a. Penentuan karakteristik biologi molekuler, seperti pemberian nama bakteri penghasil inulinase ini dan mengisolasi DNA-nya,
- b. Penentuan aktivitas inulinase yang telah dimurnikan,
- c. Penentuan tipe aksi inulinase menggunakan HPLC dengan mencari eluen yang cocok.

DAFTAR PUSTAKA

- Akhgari, A., Abbaspour, MR., Rezaee, S., dan Kuchak, A. 2011. Evaluation of The Swelling, Erosion and Drug Release from Polysaccharide Matrix Tablets Based On Pectin and Inulin. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*. 6(1): 51-58.
- Allais, JJ., Kammou, S., Blanc, P., Girard, C., dan Baratti, J. 1986. "Isolation and Characteristic of Bacterial Strains with Inulinase Activity". *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (50):1086-1090.
- Arasaratnam, V dan Thayaananthan, K. 2014. "Isolation of A Thermophilic Bacterium to Produce Thermostable α -amylase". *European Journal of Experimental Biology*. 4(3): 576-582.
- Azhar, M., Syukur, S., Natalia, D., Vovien dan Jamsuri. 2011. "Skrining dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Inulin dari Sumber Air Panas Padang Balimbiang di Solok". *Jurnal Riset Kimia*. 5(1): 32-39.
- Azhar, M., Syukur, S., Natalia, D., Fitri, M., Vovien dan Jamsari. 2013. "Identifikasi Gen 16S rRNA Bakteri Termofilik yang Memperlihatkan Aktivitas Enzim Penghidrolisis Inulin Tipe Exo- dari Sumber Air Panas Rimbo Panti". Prosiding Seminar Nasional Kimia dan Pendidikan Kimia.
- Azhar, M., Syukur, S., Natalia, D., Vovien., Jamsari dan Munaf, E. 2013. "Characterization of Extracellular Enzyme and Identification of Inulin Degrading Bacteria from Hot Springs in West Sumatra, Indonesia". *International Journal Chemistry*. 2(1): 33-41.
- Bergner, P. 2004. "inulin". <http://www.medherb.com>. Diakses 29 Agustus 2014.
- Bintang, Maria. 2010. *Biokimia Teknik Penelitian*. Jakarta: Erlangga.
- Bisht, S.P.S dan Panda, A.K. 2011. " Isolation and Identification of New Lipolytic Thermophilic Bacteria from An Indian Hot Spring". *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2(2): 229-235.
- CAZy. 2014. Glycoside Hydrolase Family 32. <http://www.cazy.org/GH32.html>. diakses 26 September 2014.
- Cruz, V., Belote, J.G., Belline, M.Z., dan Cruz, R. 1998. "Production and Action Pattern of Inulinase from *Aspergillus niger*-245: Hydrolysis of Inulin from Several Sources". *Revista de Microbiol.* Vol 29 No 4.
- Dong Lu, W., Li, A.X., dan Guo, Q.L. 2014. "Production of Novel Alkalitolerant and Thermostable Inulinase from Marine Actinomycete *Nocardiosis* sp.