PENENTUAN RASIO DAN AKSI INULINASE DARI CRUDE ENZIM INULINASE ISOLAT BAKTERI 55

SKRIPSI

Diajukan Sebagai Salah Satu Syarat Memperoleh Gelar Sarjana Kimia

Jurusan Kimia FMIPA UNP

Oleh:
MARDALENI FITRI
84273-2007

PROGRAM STUDI KIMIA
JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS NEGERI PADANG
2011

PERSETUJUAN SKRIPSI

PENENTUAN RASIO DAN AKSI INULINASE DARI CRUDE ENZIM INULINASE ISOLAT BAKTERI 55

Nama	: Mardaleni Fitri
Nim	: 84273 / 2007
Program Studi	: Kimia
Jurusan	: Kimia
Fakultas	: Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Juli 2011

Disetujui Oleh

Pembimbing I	Pembimbing II
Dra. Minda Azhar,M.Si	Dra. Yustini Maaruf,M.Si
NIP. 19641124 199112 2001	NIP. 19500819 198010 2001

HALAMAN PENGESAHAN

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 Aksi dan Rasio Inulinase dari Crude Enzim Inulinase Isolat Bakteri 55**

Nama : Mardaleni Fitri

NIM : 84273 / 2007

Program Studi : Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juli 2011

TIM PENGUJI

	Nama	Tanda Tangan
1. Ketua	: Dra. Minda Azhar, M.Si	1.
2. Sekretaris	: Dra. Yustini Maaruf, M.Si	2.
3. Anggota	: Drs. Iswendi, M.S	3.
4. Anggota	: Drs. Zul Afkar, M.S.	4.

SURAT PERNYATAAN

Dengan ini menyatakan bahwa skripsi ini benar-benar karya saya sendiri. Sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali sebagai acuan atau kutipan dengan mengikuti tata penulisan karya ilmiah yang lazim.

Padang, Juli 2011
Yang menyatakan

Mardaleni Fitri

".....Allah akan mengangkat (derajat) orang-orang yang beriman diantara kamu dan orang-orang yang diberi ilmu beberapa derajat....."

(QS : Al – Mujadillah, 11)

Sesungguhnya para Malaikat mengembangkan sayapnya (mendoakan) untuk pencari ilmu, sebagai ungkapan ridha kepda pencari ilmu. Dan sesungguhnya seorang yang berilmu akan dimintakan ampunan untuknya oleh semua makhluk yang ada di langit dan di bumi

(H.R Abu Daud, dari Hadist Abu Darda', 10/49, No 3157)

Alhamdulillah
Begitu banyak hidayah dan kebahagian yang Engkau berikan
Hari ini telah kuraih sebuah asa
Waktu untuk mewujudkan cita-cita dimasa yang akan datang
Setapak lagi kebahagian Engkau berikan padaku
Dengan bersujud pada mu ya Allah
Ku persembahkan kebahagian ini kepada:

Keluargaku
Almarhum ayahanda Daman Huri
Ibunda Hj Roslaini yang telah membesarkan dan memberi kasih sayangnya kepadaku
Terima kasih buat kakak-kakakku yang telah memberikan semangat dan bantuan moril dan materil kepadaku
Kepada adikku yang ku sayangi yang telah memberikan dukungan dan kasih sayangnya kepadaku
Spesial buat Sugito Rolis yang memberiku motivasi dan semangat dalam menghadapi setiap masalah dalam hidupku

Sebagai balasan atas semua cinta dan kasih sayang

serta pengorbanan

yang telah diberikan untukku

Semua itu belumlah cukup.....

Tapi hanya karya kecil ini yang dapat kupersembahkan

Thanks to:

Teruntuk pembimbing I Dra. Minda Azhar, M.Si dan pembimbing II Dra. Yustini Ma'aruf, M.Si yang telah memberikan bimbingan hingga selesai skripsi ini, semoga Allah SWT membalas jasamu dan memberikan kebahagian atas dirimu

Terima kasih buat bapak ibu dosen jurusan kimia yang sudah memberikan ilmu, semoga ilmu yang diberikan dapat hendaknya saya aplikasikan dimasa depan.

Untuk sahabatku terutama ciinulin dan P2RI etanol

Terima kasih atas kebersamaannya semoga menjadi kenangan untuk selama-lamanya, kalian akan selalu ada dihatiku, serta adek adek 08 dan seterusnya...

Akhir kata terima kasih atas segala bantuan dari semua pihak serta maaf yang sedalam-dalamnya atas semua kekurangn dan kekhilafan dari penulis.

By

Mardaleni Fitri

ABSTRAK

Fitri, Mardaleni (2007). Penentuan Aksi dan Rasio Inulinase dari Crude Enzim Inulinase Isolat Bakteri 55

Inulinase merupakan kelompok enzim hidrolase yang mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktosa. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan aksi dan rasio dari inulinase pada suhu 55 °C dan pH 5. Penelitian ini merupakan penelitian kualitatif ekperimen dengan prosedur sebagai berikut, ekstraksi inulin dengan air dan etanol, penentuan kadar gula pereduksi dari hasil hidrolisis inulin dengan katalis inulinase dengan metode Nelson Smogyi, dan penentuan rasio serta aksi inulinase. Rasio aktivitas inulinase dan invertase adalah 1,164. Angka ini menyatakan kelompok enzim ini merupakan inulinase. Data Rf dari Fruktosa adalah sama dengan data Rf dari hidrolisa inulin. Data ini menunjukkan bahwa aksi dari inulinase berupa eksoinulinase.

KATA PENGANTAR

Syukur Alhamdulillah penulis ucapkan kehadirat Allah SWT, yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya terutama nikmat waktu dan kesehatan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi ini yang berjudul **"Penentuan Rasio dan Aksi Inulinase dari Crude Enzim Inulinase Isolat Bakteri 55"**. Shalawat beserta salam penulis kirimkan kepada Nabi Muhammad SAW yang telah berhasil membimbing umatnya ke jalan yang penuh dengan ilmu pengetahuan seperti saat ini.

Dalam penulisan skripsi ini, tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak baik secara langsung maupun tidak langsung. Oleh karena itu pada kesempataan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada:

1. Ibu Dra. Minda Azhar, M.Si selaku dosen pembimbing I
2. Ibu Dra, Yustini ma'aruf, M.Si selaku dosen pembimbing II
3. Bapak Drs. Nazir KS, M.Pd, M.Si selaku dosen pembimbing akademik seta ketua prosdi jurusan kimia
4. Bapak Drs. Iswendi, M.S selaku dosen pembahas
5. Ibu Dra Iryani, M.S selaku dosen pembahas
6. Seluruh staf, dosen, karyawan dan karyawati dilingkungan Jurusan Kimia FMIPA UNP.

Semoga skripsi ini bermanfaat bagi penulis dan pembaca untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan sarana informasi ilmiah.

Padang, Juli 2011

Penulis

DAFTAR ISI

ABSTRAK i

KATA PENGANTAR ii

DAFTAR ISI iii

DAFTAR TABEL v

DAFTAR GAMBAR vi

DAFTAR LAMPIRAN vii

BAB I PENDAHULUAN

A. Latar Belakang 1

B. Rumusan Masalah 3

C. Batasan Masalah 3

D. Pertanyaan penelitian 4

E. Tujuan Penelitian 4

F. Manfaat Penelitian 4

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

A. Umbi Dahlia 5

B. Inulin 6

C. Aktivitas Inulinase dan Invertase 7

D. Aksi Inulinase 10

E. Spektrofotometri Visibel 12

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian 16

B. Objek Penelitian 16

C. Alat dan Bahan 16

D. Prosedur Kerja 17

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Deskripsi Data 26

B. Analisa Data 32

C. Pembahasan 34

BAB V KESIMPULAN

A. Kesimpulan..... 41

B. Saran..... 41

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN 44

DAFTAR TABEL

Tabel : **hal**

1. Penentuan λ_{maks} dari larutan standar BSA 27

2. Absorbansi BSA pada variasi konsentrasi pada λ_{maks}. 27

3. Absorbansi larutan standar fruktosa pada berbagai λ 28

4. Pengukuran larutan standar fruktosa pada variasi konsentrasi: 29

5. Absorbansi larutan standar eqimolar pada variasi λ 29

6. Pengukuran larutan standar eqimolar fruktosa dan glukosa dengan berbagai konsentrasi 30

7. Pengukuran absorbansi aktivitas crude inulinase 31

8. Jarak tempuh komponen hasil hidrolisis inulin terhadap inulinase 31

9. Rasio dari aktivitas inulinase dan aktivitas inverttase 33

DAFTAR GAMBAR

Gambar : **hal**

1. Bunga Dahlia 5

2: Struktur dari inulin 6

3. Mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada inulin 8

4. Isomerisasi fruktosa 9

5. Persamaan reaksi arsenomolibdat dengan glukosa. 10

6. Hidrolisis inulin menjadi FOS 11

7. Penentuan produk hidrolisis dari inulinase *A parasiticus* (TLC) 11

8. Penentuan produk hidrolisis dari inulinase *T. wride* (TLC) 12

9. Inulin 34

10. Uji kualitatif inulin 35

11. Uji kualitatif inulinase 35

12. Produk hidrolisis dari crude inulinase (TLC) 39

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran : **hal**

1. Ekstraksi Inulin 44

2. Penentuan λ_{maks} Larutan Standar Albumin..... 45

3. Pembuatan Kurva Standar Albumin dan Uji Kadar Protein pada Crude Inulinase..... 46

4. Penentuan λ_{maks} Larutan Standar Fruktosa dan Larutan Standar Eqimolar Fruktosa dan Glukosa 47

5. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fruktosa dan Absorbansi Larutan Standar Eqimolar Fruktosa dan Glukosa 48

6. Penentuan Aktivitas Inulinase 49

7. Penentuan Aksi Inulinase Menggunakan TLC 50

8. Kurva Panjang Gelombang Maksimum albumin dan Konsentrasi Larutan Standar BSA..... 51

9. Kurva Panjang Gelombang Maksimum dan Konsentrasi Larutan Standar Fruktosa dan Eqimolar Fruktosa dan Glukosa 52

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Fruktosa dapat diproduksi dari inulin maupun dari pati. Fruktosa diproduksi dari molekul pati memerlukan tiga tahap reaksi enzimatis yaitu tahap hidrolisis dimana digunakan bantuan enzim amilase untuk menghidrolisis pati menjadi campuran dekstrin, berikutnya amiloglukosidase memecah dekstrin menjadi glukosa, dan isomerase untuk mengkonversi glukosa menjadi fruktosa (Admin, 2003:1). Rendemen fruktosa yang dihasilkan dari cara ini sekitar 48%. Fruktosa juga dapat diperoleh secara lansung dari hidrolisis inulin dengan katalis inulinase yang dapat menghasilkan sekitar 98% fruktosa (Wijarnaka, 2007:52).

Inulin adalah senyawa karbohidrat (polisakarida) alamiah yang merupakan polimer dari unit-unit fruktosa. Polisakarida ini dapat dihasilkan oleh tanaman umbi-umbian namun dalam jumlah besar dapat ditemukan pada umbi dahlia, umbi Jerusalem artichoke, chicory, dan delion. Dalam jumlah sedikit inulin terdapat pada bawang merah, bawang putih, asparagus, dan gandum (Asih, 2009:3).

Inulin merupakan rantai panjang yang terdiri dari glukosa dan unit-unit fruktosa. Fruktosa dari inulin diperoleh dengan cara hidrolisis dengan bantuan inulinase. Inulinase adalah enzim hidrolitik yang mengkatalis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa dan frutooligosakarida. Enzim ini dapat dihasilkan oleh bakteri, jamur maupun tumbuh-tumbuhan (Vandame, 1983).

Enzim inulinase dalam menghidrolisis inulin menjadi fruktosa memiliki aktivitas katalitik tertentu. Aktivitas katalik enzim ini dapat diketahui dari

perbandingan rasio inulinase (perbandingan aktivitas inulinase dengan aktivitas invertase). Saryono (1999) mengukapkan uji aktivitas inulinase 25 mL larutan inulin 5% dari umbi dahlia dengan katalis inulinase menghasilkan I,43 mg/mL gula reduksi. Sedangkan untuk Penentuan rasio inulinase dilakukan oleh Wijanarka (2007) pada suatu khamir yang diisolasi dari umbi dahlia dengan variasi konsentrasi Ammonium Nitrat dan variasi waktu inkubasi dimana hasil rasio inulinase yang diperoleh tidak mempengaruhi rasio inulinase sebelum penambahan Ammonium Nitrat. Rasio (I/S) dengan nilai lebih dari satu memiliki arti mayoritas aktivitas enzim yang dihasilkan adalah inulinase, sedangkan rasio (I/S) kurang dari satu adalah invertase (Ettalibi dan Baratti, 1987:1).

Hidrolisis enzimatis pada inulin dapat terjadi atas aksi Ekso atau Endo inulinase. Aksi Ekso inulinase yaitu aksi yang menghidrolisis inulin menjadi bagian-bagian unit fruktosa sedangkan aksi Endo inulinase yaitu aksi yang dapat menghidrolisis inulin menjadi fruktooligosakarida. Untuk melihat apakah suatu inulinase bersifat Endo atau Ekso dapat dilihat dari produk yang terbentuk dengan menggunakan TLC. Jika produk yang dihasilkan pada TLC memiliki Rf yang sama dengan fruktosa standar maka dapat dikatakan produk hidrolisis inulin adalah fruktosa, dan jika produk yang dihasilkan pada TLC memiliki Rf yang lebih kecil dari fruktosa standar maka dapat dikatakan produk hidrolisis inulin merupakan oligosakarida.

Penelitian penentuan aktivitas optimum inulinase dari umbi dahlia yang diekstrak dengan etanol menghasilkan aktivitas optimum pada suhu 55 °C dan pH 5 (Khairani, 2006:43). Penentuan aktivitas optimum inulinase hasil ekstraksi

dengan aseton dari umbi dahlia merupakan penelitian selanjutnya yang dilakukan Yulesmi (2008:47) dimana aktivitas optimum diperoleh pada suhu 50 °C dan pH-5, Penelitian ini sama sekali belum membahas perbadingan aktivitas inulinase dengan aktivitas invertase (rasio) dan aksi dari inulinase dalam menghidrolisis inulin, selain itu pada penelitian sebelumnya inulinase yang digunakan masih berasal dari umbi dahlia, belum menggunakan sumber dari bakteri.

Berdasarkan hal ini maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap crude enzim inulinase yang berasal dari bakteri dengan judul "**Penentuan Rasio dan Aksi Inulinase dari Crude Enzim Inulinase Isolat Bakteri 55".**

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah berapa rasio aktivitas inulinase dengan aktifitas invertase dan bagaimana aksi hidrolisis crude inulinase menggunakan TLC ?

C. Batasan Masalah

1. Pengukuran rasio inulinase dari crude inulinase isolat bakteri 55 dilakukan dengan alat spektrofotometer visibel.
2. Penentuan aksi hidrolisis inulinase dari crude inulinase isolat bakteri 55 dilakukan menggunakan TLC.
3. Suhu yang digunakan dalam pengukuran rasio aktivitas inulinase dan invertase pada crude inulinase isolat bakteri 55 yaitu suhu 55 °C.
4. Pengukuran rasio aktivitas inulinase dan aktivitas invertase dari crude inulinase isolat bakteri 55 adalah pada pH 5.

D. Pertanyaan penelitian

Berapa rasio aktivitas inulinase dengan aktivitas invertase serta apakah jenis aksi hidrolisis dari crude inulinase dengan TLC ?

E. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menentukan rasio aktivitas inulinase dengan aktivitas invertase dan menentukan aksi hidrolisis crude inulinase dengan menggunakan TLC.

F. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah sebagai salah satu informasi untuk mengetahui berapa rasio aktifitas inulinase dengan aktifitas invertase dengan menggunakan spektrofotometer dan mengetahui aksi hidrolisis inulin dengan katalis inulinase menggunakan TLC.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Umbi Dahlia

Dahlia (*Dahlia pinnata Cav)* merupakan salah satu tanaman hias berbunga indah. Namun secara taksonomi tanaman dahlia merupakan tanaman perdu berumbi yang sifatnya tahunan (perenial). Tanaman ini berbunga pada musim panas sampai musim gugur. Dahlia berasal dari Meksiko dan mulai dibudidayakan di Eropa tahun 1789, tepatnya di Royal Botanical Garden Madrid, Spanyol, kemudian menyebar ke seluruh Eropa Barat. Di Indonesia, tanaman Dahlia pertama kali dikembangkan di Jawa Barat, pada masa pemerintahan kolonial Hindia Belanda (Kukun, 2004:2).

Bunga Dahlia secara umum digunakan sebagai komoditi bunga potong atau bunga pot yang banyak dibudidayakan diberbagai daerah di Indonesia (Kukun, 2004:2). Salah satu jenis bunga dahlia dapat dilihat pada Gambar 1.

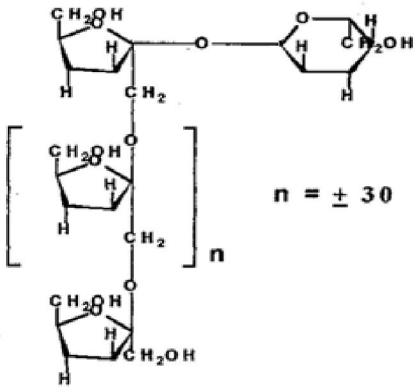
Gambar 1. Bunga Dahlia

Potensi lain yang sangat menjanjikan dari tanaman dahlia adalah adanya kandungan karbohidrat didalam umbi. Dalam umbi dahlia terkandung polimer pemanis alami inulin. Dahlia menghasilkan umbi yang mengandung 69,50-

75.48% inulin, yang berpotensi untuk dihidrolisis menjadi sirup fruktosa dan fruktooligosakarida (Wijanarka, 2004:58).

B. Inulin

Inulin adalah senyawa karbohidrat alamiah yang merupakan polimer dari unit-unit fruktosa. Inulin termasuk ke dalam kategori serat yang disebut fruktan yakni suatu polisakarida yang dibangun oleh unit-unit monomer fruktosa melalui ikatan ß-2-1 fruktofuranosida yang diawali oleh satu molekul glukosa. Pada umumnya satu rantai inulin terdiri atas 30 fruktosa tetapi ada juga inulin mengandung 18 fruktosa dan satu glukosa. Struktur dari inulin tidak selalu berupa rantai lurus, namun juga dapat bercabang seperti yang berasal dari akar tanaman *chicorium intybus* yang mengandung sedikit ikatan β-2,1 dirantai utamanya. Untuk struktur inulin dapat dimuat pada Gambar 2.



Gambar 2: Struktur dari inulin
(Simanjuntak, 2004:6)

Inulin sedikit larut dalam air dingin, bahkan dalam air yang bersuhu 55 ^{0}C jumlah inulin yang larut hanya 5 %. Inulin dapat terhidrolisis oleh asam pada suhu tinggi yaitu diatas suhu 70-80^{0}C, berwarna putih, dan memiliki massa molekul

relatif beragam antara 3500-5500 g/mol. Hidrolisis inulin dengan enzim inulinase menghasilkan formasi D-fruktosa dengan jumlah yang lebih banyak dibandingkan glukosa. Fruktosa mempunyai derajat kemanisan 1,5 sampai 2,5 kali lebih manis dibandingkan sukrosa oleh karena itu fruktosa lebih disukai sebagai pemanis. Selain itu fruktosa juga tidak menyebabkan karies pada gigi (Simanjuntak, 2004:8).

C. Aktivitas Inulinase dan Invertase

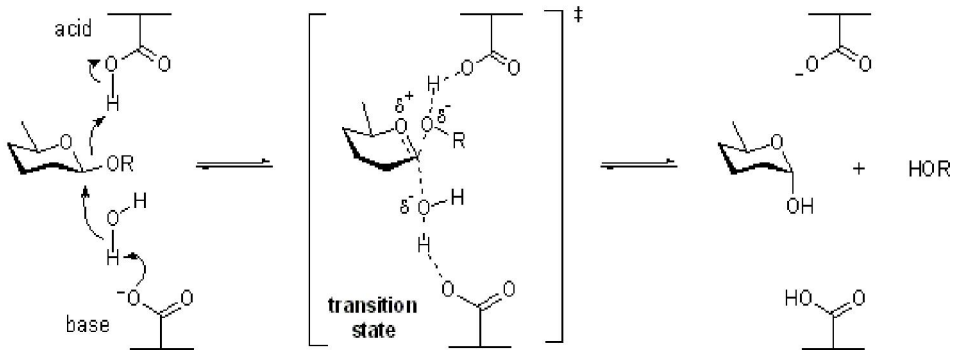
Aktivitas enzim adalah kemampuan enzim untuk menghidrolisis satu mikromolekul subtrat menjadi produk dalam satuan waktu pada kondisi tertentu. Aktivitas enzim pada inulin dapat berupa aktivitas invertase dan aktivitas inulinase. Aktivitas inulinase adalah jumlah fruktosa yang dihasilkan dalam setiap menit dalam satuan mikromolekul pada kondisi tertentu, sedangkan Aktivitas invertase adalah jumlah gula inverst yang dihasilkan dalam setiap menit dalam satuan mikromolekul oleh pada kondisi tertentu (Ertan 2003:3).

Inulinase dengan aktivitas β-fruktosidase dapat ditemukan dalam tanaman (akar chicory dan delion) maupun dalam mikroba (kapang, khamir, dan bakteri), namun aktivitas enzim dari tanaman tidak sebesar aktivitas enzim pada mikroba. Pengukuran aktivitas enzim katalitik inulinase meliputi aktivitas inulinase dan invertase. Perbandingan aktivitas dari inulinase akan melihatkan rasio dari inulinase tersebut.

Inulinase merupakan kelompok dari enzim GH 32 (Glycosidase Hidrolases). Salah satu dari mekanisme reaksi hidrolisis inulin dengan katalis ekso inulinase yang telah ditemukan berasal dari *Aspergillus awamori*.

Aspergillus awamori merupakan salah satu jamur penghasil inulinase. Sisi aktif mengandung residu-residu asam amino yang berperan dalam pemutusan ikatan glikosida antara fruktosa dalam inulin, *Aspergillus awamori* memiliki 516 buah residu asam amino (Basso, 2009). Sisi katalitik yang berperan membantu reaksi hidrolisis inulin pada inulinase dari *aspergilus awamori* adalah as aspartat 41 (asp 41) dan as glutamat 241 (glu 241). Untuk mekanisme reaksi dapat dilihat pada Gambar 3.

Inverting mechanism for a β-glycosidase



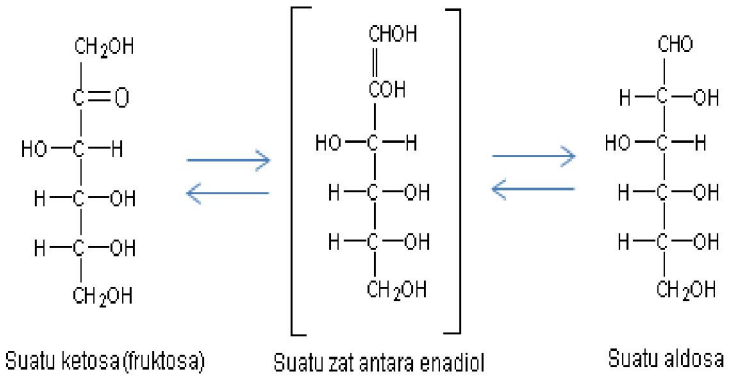
Gambar 3. Mekanisme reaksi hidrolisis inulin dengan katalis inulinase dimana R adalah monomer fruktosa (www.Cazypedia.com)

Mekanisme hidrolisis inulin pada inulinase *Aspergillus awamori* terjadi saat glukosa pada posisi β (OR berposisi cis terhadap CH_2OH). Mekanisme reaksi ini mengikuti reaksi SN_2 dimana reaksi terjadi secara serempak. Enzim yang bersifat basa (nukleofil) dari sisi aktif inulinase akan menyerang H_2O sehingga H_2O akan kehilangan satu atom H membentuk suatu OH^- yang bertindak sebagai nukleofil, nukleofil yang terbentuk akan menyerang suatu molekul (substrat) dari arah belakang molekul dan bersamaan dengan itu putus ikatan antara karbon dengan gugus OR dari substrat, gugus OR yang lepas akan membentuk suatu

alkohol dengan menangkap satu atom H dari sisi aktif enzim inulinase yang bersifat sebagai asam (Gambar 3).

Syarat utama reaksi untuk bekerja pada substrat adalah adanya kontak antara enzim dengan substrat yang dapat menyebabkan terjadinya kompleks enzim dengan substrat. Kompleks ini merupakan kompleks aktif yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi.

Absorbansi gula Pereduksi inulin denan katalis inulinase ditentukan berdasarkan metoda Nelson Somogyi. Metoda ini melibatkan dua tahap reaksi yaitu reaksi gula pereduksi dengan Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata. Kemudian reaksi kedua adalah Cu_2O dengan pereaksi arsenomolibdat. Gula Pereduksi merupakan suatu gula yang mengandung gugus aldehid atau gugus α hidroksiketon yang dapat dioksidasi oleh zat pengoksidasi. Fruktosa dapat teroksidasi karena dalam larutan basa, fruktosa berada dalam kesetimbangan dengan dua aldehid diastomerik serta membentuk suatu zat antara tautomerik enadiol (Fessenden, 1982:320). Struktur ini terlihat pada Gambar 4.



Gambar 4: Isomerisasi fruktosa
(fessenden, 1982:320)

Pembuatan pereaksi arsenomolibdat dilakukan dengan penambahan asam sulfat ke dalam amonium molibdat untuk menghasilkan asam molibdat (H_2MoO_4) yang larut pada kondisi asam berlebih. Arsenat dengan amonium molibdat (dari asam molibdat) bereaksi menghasilkan arsenomolibdat berwarna kuning. Arsenomolibdat yang dihasilkan akan direduksi oleh tembaga (II) oksida dari hasil reaksi tahap pertama sehingga dihasilkan kompleks Molybdenum blue (Gambar 5), yang mempunyai panjang gelombang maksimum 740 nm dan intensitas ini tidak mengalami perubahan dalam 24 jam (Vogel, 2007).

$(NH_4)_4Mo_7O_{24}.4H_2O + 3H_2SO_4 \longrightarrow 7H_2MoO_4 + 3(NH_4)_2SO_4$
Amonium molibdat

$12MoO_4^{2-} + AsO_4^{3-} + 24H^+ \longrightarrow [AsMo_{12}O_{40}]^{3-} + 12H_2O$
Arsenat — Arsenomolibdat

$Cu_2O_{(s)} + H_2SO_4 \longrightarrow Cu_2SO_4 + H_2O$

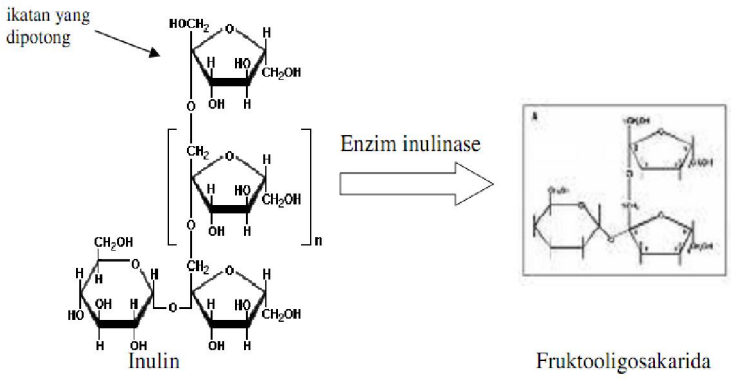
$[AsMo_{12}O_{40}]^{3-} + Cu_2SO_4 + H_2O \longrightarrow [AsMo_{12}O_{40}]^{7-} + CuO$
Arsenomolibdat (kuning) — Kompleks Molibdenum biru

Gambar 5: Reaksi pembentukan kompleks molibdenum biru
Sumber : (Vogel, 2007)

D. Aksi Inulinase

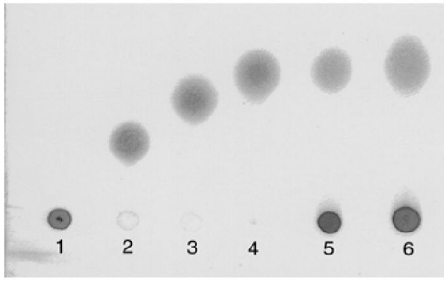
Inulinase adalah enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis inulin menjadi fruktosa atau fruktooligosakarida. Enzim dapat dihasilkan oleh mikroba, jamur maupun tumbuh-tumbuhan. Namun demikian bila dibandingkan dengan sumber enzim dari tumbuhan atau hewan, enzim dari mikroba diketahui lebih berpotensi sebagai penghasil enzim inulinase. Hal ini disebabkan pertumbuhan mikroba yang relative cepat (wijanarka, 2004:58).

Hidrolisis inulin menjadi fruktosa didasarkan pada aksi ekso inulinase sedangkan hidrolisis inulin menjadi fruktooligosakarida didasarkan pada aksi endo inulinase. Aksi ekso inulinase yaitu pemutusan unit fruktosa dari molekul inulin menjadi bagian terminal fruktosa baik pemutusannya berupa β-D-fruktopiranosa maupun berupa β-D-fruktofuranosa. Aksi endo inulinase yaitu pemutusan molekul inulin menjadi unit fruktooligosakarida, pemutusan ini terjadi pada ikatan β-2-1 fruktofuranosida yang dapat dilihat pada Gambar 6.

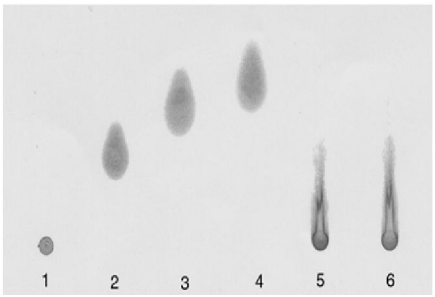


Gambar 6: Hidrolisis inulin menjadi FOS
(Asih, 2009:12)

Aksi dari inulinase dapat dilihat dengan menggunakan TLC seperti yang telah dilakukan oleh Ertan, dkk (2003:4) dimana hasilnya pada gambar 7 dan 8.



Gambar 7: Produk hidrolisis dari inulinase *A parasiticus* (TLC)
1. Inulin 2. Sukrosa 3. Glukosa 4. Fruktosa 5 dan 6 Sampel
(Ertan, 2003:4)



Gambar 8 : Produk hidrolisis dari inulinase *T. wride* (TLC)
1. Inulin 2. Sukrosa 3. Glukosa 4. Fruktosa 5 dan 6. Sampel
(Ertan, 2003:5)

Produk hidrolisis inulin dengan katalis inulinase yang ditotolkan pada TLC akan dipisahkan oleh eluen berdasarkan komponen-komponennya. Jika produk yang dihasilkan mempunyai Rf yang sama dengan fruktosa standar maka dapat diartikan bahwa produk hidrolisis inulin adalah fruktosa. Produk ini terbentuk karena aksi ekso inulinase (Gambar 7). Sebalik, jika produk yang dihasilkan oligosakarida maka harga yang didapatkan akan jauh lebih kecil dari fruktosa (Gambar 8). Hal ini dapat diartikan bahwa produk ini terbentuk karena aksi endo inulinase (Ertan, 2003:4).

E. Spektrofotometri Visibel

Spektrofotometri Visibel adalah suatu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik yaitu cahaya tampak (visible). Panjang gelombang sinar tampak 400 sampai 750 nm. Visibel lebih banyak digunakan untuk penentuan kadar suatu senyawa. Penentuan aktivitas secara kualitatif dari inulinase dapat dilakukan dengan metoda Nelson-Somogyi, pada metode Nelson-Somogyi digunakan reagen Nelson dan arsenomolibdat yang fungsinya sebagai reaksi pewarnaan spesifik. Dengan adanya reagen ini, sampel dapat diukur pada

daerah sinar tampak (visibel) karena reangen berfungsi sebagai pemberi warna pada sampel yang akan dianalisa.

Spektroskopi Visibel sangat kuantitatif dan jumlah sinar yang diserap oleh sampel sebanding dengan panjang lintasan cahaya dan konsentrasi senyawa-senyawa yang dapat menyerap radiasi daerah sinar tampak (400-750 nm) (Sastrohamidjojo, 199:3). Analisa dengan instrument ini dilakukan dengan penentuan absorbansi dari larutan sampel yang diukur. Prinsip penentuan spektrofotometer Visibel adalah aplikasi dari Hukum Lambert-Beer, yaitu:

$$\mathbf{A = - \log T = \varepsilon .b . c}$$

Dimana:

A = Absorbansi dari sampel yang akan diukur

ε = Absorptivitas molar

T = Transmitansi

b = Tebal kuvet yang digunakan (cm)

c = Konsentrasi dari sampel (M)

F. TLC (Thin Layer Chromatografy)

TLC dikembangkan oleh Izmailoff dan Schraiber pada tahun 1938. Teknik ini merupakan suatu cara pemisahan komponen senyawa kimia diantara dua fase, yaitu fase gerak dan fase diam. Teknik tersebut hingga saat ini masih digunakan untuk mengidentifikasi senyawa-senyawa kimia karena murah, sederhana, serta dapat menganalisis beberapa komponen secara serempak (Hernani, 2003:1).

Pemisahan komponen dengan TLC disebabkan oleh Perbedaan interaksi dari berbagai molekul komponen dengan fasa diam yang menyebabkan komponen

molekul bergerak dalam kecepatan yang berbeda, hingga akhirnya komponen tersebut terpisah satu sama lain. Begitu juga dengan inulin, jika hasil hidrolisis inulin dengan inulinase dilakukan pemisahan komponen dengan menggunakan TLC maka akan terjadi pemisahan antara komponen . Pemisahan itu dapat berupa aksi Endo inulinase dan Ekso inulinase (Ertan, 2003:4).

Mekanisme pemisahannya adalah adsorbsi yang terjadi karena fasa diamnya berupa padat dan fasa gerak berupa cairan. Kekuatan adsorbsi berbagai komponen molekul cuplikan pada zat adsorben itu tidak sama, Sehingga komponen tersebut akan bergerak dengan kecepatan yang berbeda. Untuk menentukan komponen yang terdapat pada kromatogram digunakan faktor retensi atau factor retardasi (Rf)

$$Rf = \frac{\text{Jarak yang ditempuh noda komponen}}{\text{Jarak yang ditepuh front eluen}}$$

Hidrolisis produk dari inulin pada TLC digunakan fasa gerak berupa lempeng alumina silica gel. Karena adanya efek kapiler maka pelarut akan merambat keatas dengan membawa komponen campuran dengan kecepatan yang berbeda-beda sehingga akan menghasilkan bentuk noda-noda terpisah (Hernani, 2003:2).

Fasa diam yang dapat digunakan dalam TLC seperti silika, alumina, dan alumina-alumunium oksida, sedangkan untuk fase gerak (eluen) yang digunakan adalah pelarut yang bersifat polar dan dapat menggantikan pelarut non polar pada ikatannya dari fase diam. Interaksi antara fase diam dengan fase gerak dipengaruhi oleh laju alir yang mengakibatkan terjadinya pemisahan komponen (Hernani, 2003:2).

Penggunaan TLC untuk penentuan komponen produk hidrolisis inulin dengan katalis inulinase dapat digunakan bermacam eluen diantaranya, nitroetana/asetonitril/etanol/aquades 1:4:3:2 (vol/vol/vol/vol) (Erichwanker, Antonhuber, And Helmutschwad, 1995:1955), metanol-aseton-aquades 40:50:10 (vol/vol/vol) (Marcin Skowronek and Jan Fiedurek, 2005:54). akan tetapi dari hasil pengujian sebelumnya eluen yang berupa asam asetat, klorofrom, air dengan perbandingan 35 : 30 : 5 lebih menghasilkan pemisahan yang lebih baik ini terlihat pada pengujian produk inulinase dari *penicillium spinulosa, aspergilus para siticus* dan *trichoderma viridian* dimana digunakan eluen berupa asam asetat, klorofrom, air dengan perbandingan 35 : 30 : 5. Hasil yang diperoleh dari aksi inulinase menunjukkan bahwa *penicillium spinulosa* dan *aspergilus para siticus* berupa aksi Ekso inulinase sedangkan *trichoderma viridian* berupa hasil Endo inulinase (Ertan, 200:3).

BAB V

KESIMPULAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan tentang penentuan aksi dan rasio inulinase dapat disimpulkan bahwa rasio katalitik dari crude inulinase adalah 1,364 yang berarti bahwa aktivitasnya adalah aktivitas inulinase sedangkan untuk aksi inulinase merupakan aksi eksoinulinase.

B. Saran

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, maka disarankan melakukan penelitian lebih lanjut, yaitu

1. Penentuan aksi dan rasio inulinase pada inulinase yang telah dimurnikan baik dengan pelarut organik atau anorganik.
2. Membandingkan antara aksi dan rasio inulinase pada crude enzim dengan aksi dan rasio inulinase pada enzim murni.

DAFTAR PUSTAKA

Andyani, N.F. 2001. *Produksi Sirup Fruktosa dari Inulin Dahlia Pinnata Cav. secara Hidrolisis Asam.* Bogor : Fakultas Teknologi IPB.

Anonim. 2004. " Glycoside Hydrolases." *www.Cazypedia.org*. diakses tanggal : 20 Juni 2011

Asih, Sri.dkk.(2009). *Pemanfaatan Aspergilus Clavatus Pada Produksi Fruktooligosakarida (Fos) dari Umbi Dahlia Sebagai Sumber Perebiotik Susu Formula Balita*. Intitut Pertanian Bogor: Bogor.

Basso, Alessandra. dkk. 2009. *Endo-and Exo-Inulinases: Enzyme-Substrate Interaction and Rational Immobilization.* Crit Rev Biotechnol vol 3

Diah, Athiya N. M, 2007. *Studi Aktivitas Spesifik Selulosa Dari Lactobacillus Collinoides yang Dimurnikan Dengan Pengendapan Bertingkat Ammonium Sulfat.* Universitas Brawijaya: Malang.

Ettalibi, M and C. Baratti. 1987. *Purification, Properties and Comparison Invertase, Exoinulinase and Endoinulinase of Aspergillus ficuum. Appl.Microbiol. Biotechnol*. 26: 13-20.

Erichwanker, Antonhuber, And Helmutschwab1 (1995). *Purificati onand Characterizationofthe Bacillussubtilis Levanase Producedin Escherichiacoli.* Vol.61,No.5

Ertan ,figen and filiz ,ekinci.(2002) *The Production Of Inulinases From Alternaria Alternata, Aspergillus Niger* And *Trichoderma Harzianum*. Division of Molecular Biology, Department of Biology, Faculty of Science and Art, Trakya University,Güllapoglu – Edirne, Turkey.

Fessenden, Fessendan. 1986. *Kimia Organik.* Diterjemahkan oleh A. Hadyana pudjatmaka Bandung: Erlangga.

Febriani, Yulin. 2006. *Penentuan Aktivitas Ekstrak Inulinase pada Subtrat Inulin Hasil Ekstraksi dengan Etanol dari Umbi Dahlia*. Kimia 2000: Universitas Negeri Padang.

Hernani. 1999. *Teknik identifikasi bahan aktif pada tumbuhan obat. maksalah pada Seminar Pendalaman Materi di Balai Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, Bogor. 13 hlm.