

**PENENTUAN AKTIVITAS OPTIMUM CRUDE INULINASE DARI ISOLAT
BAKTERI 55**

SKRIPSI

Diajukan sebagai Salah Satu Persyaratan Memperoleh Gelar Sarjana Sains



Oleh

NURWIDYA SARI

NIM/BP: 84255/2007

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

PERSETUJUAN SKRIPSI

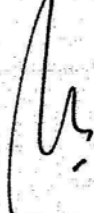
PENENTUAN AKTIVITAS OPTIMUM CRUDE INULINASE DARI ISOLAT BAKTERI 55

Nama : NURWIDYA SARI
NIM/BP : 84255/2007
Jurusan : Kimia
Program Studi : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juli 2011

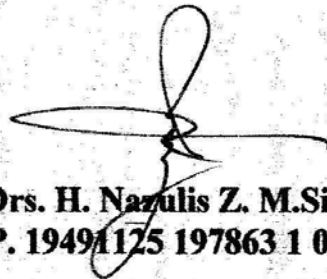
Disetujui oleh:

Pembimbing I



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

Pembimbing II



Drs. H. Nazulis Z. M.Si
NIP. 19491125 197863 1 001

PENGESAHAN

**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 Crude Inulinase dari
Isolat Bakteri 55**

Nama : NURWIDYA SARI

NIM : 84255

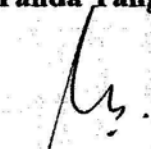
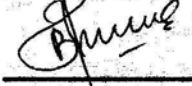
Program Studi : Kimia

Jurusan : Kimia

Fakultas : Matematika Dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juli 2011

Tim Penguji

	Nama	Tanda Tangan
1. Ketua	: Dra. Minda Azhar, M.Si.	
2. Sekretaris	: Drs. H. Nazulis Z, M.Si.	
3. Anggota	: Dr. Usman Bakar, M.Ed, St.	
4. Anggota	: Dra. Iryani, M. S.	

ABSTRAK

Sari, Nurwidya. 2011. “Penentuan Aktivitas Optimum Crude Inulinase dari Isolat Bakteri 55”.

Inulinase merupakan enzim yang dapat mengkatalis reaksi hidrolisis inulin menjadi unit fruktosa dan fruktooligosakarida. Tujuan penelitian ini adalah menentukan pH, suhu dan konsentrasi substrat optimum aktivitas crude inulinase dari isolat bakteri 55. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen yang telah dilakukan di Laboratorium Kimia FMIPA UNP. Penentuan kadar gula pereduksi hasil hidrolisis inulin dengan katalis inulinase menggunakan metoda Nelson-Somogy. Variasi pH yang digunakan adalah 4,5, 5, 5,5, 6 dan 6,5. Variasi suhu yang digunakan adalah (45, 50, 55, 60 dan 65)^o C. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah (0,5%, 1%, 2% dan 3 %) b/v. Hasil penelitian menunjukkan bahwa aktivitas crude inulinase dari isolate bakteri 55 optimum pada pH 5 sebesar $1,852 \times 10^{-2}$ U/ml dan aktivitas spesifik $5,73 \times 10^{-4}$ U/ μ g. Suhu optimum aktivitas crude inulinase yaitu 55^o C dengan aktivitas sebesar $1,689 \times 10^{-2}$ U/ml dan aktivitas spesifik $5,36 \times 10^{-4}$ U/ μ g. Aktivitas crude inulinase optimum pada konsentrasi substrat 1% b/v dengan aktivitas sebesar $6,2 \times 10^{-3}$ U / mL dengan nilai Km dan Vmak yaitu 0,28 % b/v dan 40 U/ml.

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr.Wb.

Syukur alhamdulillah kami panjatkan kepada Allah SWT pemilik alam semesta atas nikmat, kasih sayang dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan pelaksanaan penelitian dan skripsi ini. Salawat beserta salam selalu tercurah kepada junjungan kita Nabi besar Muhammad SAW.

Penulisan skripsi ini berjudul “**Penentuan Aktivitas Optimum Crude Inulinase dari Isolat Bakteri 55**”. Skripsi ini diajukan untuk memenuhi persyaratan menyelesaikan program Sarjana Sains, Program Studi Kimia, Jurusan Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Negeri Padang.

Kelancaran penelitian dan penulisan skripsi ini, tentunya tidak lepas dari bantuan, bimbingan dan dorongan dari semua pihak baik secara materil maupun moril. Oleh karena itu penulis mengucapkan banyak terima kasih kepada ibunda Dra. Minda Azhar, M.Si sebagai dosen pembimbing I dan Bapak Drs. H. Nazulis Z. M.Si sebagai dosen pembimbing II yang telah meluangkan waktu, tenaga, pikiran serta kesabarannya untuk membimbing dalam pelaksanaan penelitian dan penulisan skripsi ini.

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Bapak Drs. Iswendi. M. S, Ibu Dra. Iryani. M. S, dan Bapak Dr. Usman Bakar. M. Ed. ST, selaku dosen pembahas yang telah memberi masukan dan saran dalam penelitian dan penulisan skripsi ini. Kepada Bapak Drs. Zul Afkar, M. S. sebagai Ketua Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang dan Ibu Dra. Hj. Isniyetti, M. S. sebagai Kepala Laboratorium Kimia yang telah memberikan izin melakukan penelitian di Laboratorium Kimia Universitas Negeri Padang.

Kepada Bapak Zaitul Hamid, Ibu Dasnawati dan Ibu Dasmawati selaku laboran yang telah membantu dalam penyediaan alat dan bahan. Kepada seluruh staf pengajar Jurusan Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang yang telah memberikan ilmu dan pengetahuan selama masa perkuliahan. Kepada kedua orang tua yang selalu memberikan do'a, dorongan, dan bantuan baik moril maupun materil. Teman-teman Kimia FMIPA Universitas Negeri Padang yang telah memberikan semangat dan motivasi serta informasi sehingga penelitian dapat dilakukan dengan baik.

Semoga segala amal baik Bapak/Ibu/rekan semua diterima Allah SWT serta mendapatkan pahala besar dari-Nya, Amin. Melalui skripsi ini penulis berharap, skripsi ini dapat menjadi sumbangan khasanah ilmu pengetahuan baru bagi pembaca dan dapat sebagai acuan untuk penelitian selanjutnya.

Wasalamu'alaikum Wr.Wb.

Padang, Juli 2011

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
BAB I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang	1
B. Rumusan Masalah	2
C. Pembatasan Masalah.....	3
D. Tujuan Penelitian	3
E. Manfaat Penelitian	3
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Inulin	4
B. Aktivitas Inulinase	6
C. Spektrofotometer Visibel	9
BAB III. METODE PENELITIAN	
A. Jenis Penelitian	13
B. Variabel Penelitian	13
C. Objek Penelitian.....	13
D. Alat dan Bahan	14
E. Prosedur Kerja	14

F. Analisis Data	23
------------------------	----

BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Hasil	24
----------------	----

B. Analisis Hasil	29
-------------------------	----

C. Pembahasan	31
---------------------	----

BAB VI. PENUTUP

A. Kesimpulan	40
---------------------	----

B. Saran	40
----------------	----

DAFTAR PUSTAKA

LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur inulin	4
2. Struktur tersier inulinase dari <i>Aspergillus awamory</i>	7
3. Mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada inulin	8
4. Hukum Lambert-Beer	9
5. Reaksi D-Glukosa dengan reagen Arsenomolibdat	11
6. Reaksi kesetimbangan fruktosa membentuk aldehida diastomerik	12
7. Inulin	24
8. Grafik hubungan aktivitas inulinase dengan variasi pH	33
9. Grafik hubungan aktivitas spesifik inulinase dengan variasi pH.....	33
10. Grafik hubungan aktivitas inulinase dengan variasi suhu.....	34
11. Grafik hubungan aktivitas spesifik inulinase dengan variasi suhu.....	35
12. Grafik hubungan aktivitas inulinase dengan variasi konsentrasi Substrat.....	36
13. Grafik hubungan antara fruktosa dengan konsentrasi substrat inulin, serta penentuan K_m dan V_{maks}	37

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Tingkat kemanisan relatif beberapa jenis monosakarida	5
2. Rentangan pH dalam pencampuran buffer asetat	15
3. Absorbansi fruktosa pada berbagai variasi λ	25
4. Absorbansi larutan standar fruktosa pada λ 510 nm.....	25
5. Absorbansi albumin pada λ 630-750 nm	26
6. Absorbansi larutan standar albumin pada λ 700 nm.....	27
7. Absorbansi inulinase pada λ 700 nm.....	27
8. Absorbansi fruktosa akibat aktivitas inulinase pada variasi pH.....	28
9. Absorbansi fruktosa akibat aktivitas inulinase pada variasi suhu.....	28
10. Absorbansi fruktosa akibat aktivitas inulinase pada variasi konsentrasi substrat	29
11. Aktivitas inulinase pada variasi pH	30
12. Aktivitas inulinase pada variasi suhu.....	31
13. Aktivitas inulinase pada variasi konsentrasi substrat	31

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Ekstraksi Inulin	44
2. Uji kualitatif inulin	45
3. Penentuan λ_{maks} Larutan Standar Albumin	46
4. Pembuatan Kurva Standar Albumin	47
5. Penentuan Kadar Protein Inulinase	48
6. Kurva Regresi Larutan Standar Albumin.....	49
7. Grafik Kadar Protein Crude Inulinase Isolat 55	50
8. Uji Kualitatif Inulinase.....	51
9. Penentuan λ_{maks} Larutan Standar Fruktosa	52
10. Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fruktosa	53
11. Kurva Regresi Larutan Standar Fruktosa	54
12. Penentuan Aktivitas Optimum Crude Inulinase dengan Variasi pH (4, 4,5, 5, 5,5 dan 6).....	55
13. Penentuan Aktivitas Optimum Crude Inulinase dengan Variasi Suhu (45, 50, 55, 60 dan 65) ^o C.....	56
14. Penentuan Aktivitas Optimum Crude Inulinase dengan Variasi Konsentrasi Substrat (0,5, 1, 2, dan 3)% b/v.....	57
15. Dokumentasi ekstraksi inulin dari umbi Dahlia.....	58
16. Dokumentasi pengukuran aktivitas inulinase.....	59
17. Dokumentasi uji kualitatif inulin dan inulinase.....	60

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Fruktosa merupakan monosakarida yang dapat digunakan sebagai sumber pemanis alternatif yang aman bagi kesehatan. Hal ini menyebabkan fruktosa potensial digunakan dalam industri pangan. Penggunaan fruktosa sebagai pemanis alami biasanya dalam bentuk sirup fruktosa. Konsumsi sirup fruktosa diketahui tidak menyebabkan toksisitas, karsinogen, dan moralitas (Park, *et al.* 2001). Fruktosa memiliki tingkat kemanisan yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan sukrosa, glukosa dan gula-gula lainnya. Hal ini menyebabkan pengkonsumsian fruktosa lebih disukai dikalangan masyarakat (Wijanarka,dkk.2007).

Salah satu sumber fruktosa adalah inulin. Inulin merupakan polimer dari unit fruktosa yang dihasilkan dalam jumlah besar pada umbi dahlia. Umbi dahlia mengandung 80 % air dan 20 % padatan. Padatan ini tersusun $\pm$ 85 % inulin dan sisanya adalah bahan berselulosa (Kukun, 2004). Hidrolisis inulin menjadi fruktosa secara enzimatis lebih menguntungkan karena lebih murah, mudah di ekstraksi, produk yang dihasilkan lebih jernih dan manis . Hidrolisis inulin menjadi fruktosa hanya memerlukan satu kali tahapan reaksi enzimatis. Hasil yang diperoleh pun dua kali lebih banyak dibandingkan hidrolisis pati menjadi fruktosa, sekitar 98% fruktosa yang dihasilkan (Saryono, 1999).

Inulinase dapat dihasilkan dari bakteri, jamur maupun tumbuh-tumbuhan penghasil inulin. Isolasi inulinase dari bakteri lebih menguntungkan karena pertumbuhannya yang relatif lebih cepat. (Wijanarka , 2004). Aktivitas inulinase

dipengaruhi oleh konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, suhu, pH dan waktu inkubasi (Ekadini, 2009).

Suhu dan pH optimum dari mikroorganisme yang berbeda memiliki aktivitas yang berbeda pula. Suhu dan pH optimal dari ragi *Cryptococcus aureus* adalah 50° C dan 5 (Sheng, *et al* 2008), sedangkan pada ragi *Klueveromichia marcianus* memiliki suhu dan pH optimum 55° C dan 4,4 (Shingh. *et.al.* 2007). pH optimal rata-rata pada ragi dan jamur berkisar antara 4,5-6,0 (Sheng. *et.al.* 2008). Pada bakteri rata-rata memiliki suhu dan pH optimum yang lebih besar dari ragi dan jamur. Suhu dan pH optimum aktivitas bakteri *Geobacillus stearothermophilus* yaitu 60° C dan 6,0 (Tsujimoto. *et.al.* 2003). Pada bakteri *Pseudomonas mucidolens* memiliki pH 6,0 dan suhu 55° C untuk aktivitas optimumnya (Kwon *et.al.* 2000).

Inulinase dapat diperoleh dari bakteri termofilik penghasil inulinase. Bakteri penghasil inulinase telah diisolasi dari sumber air panas Sumatera Barat yang di beri kode laboratorium – 55 (Azhar, data belum dipublikasikan). Inulinase dari bakteri isolat 55 ini belum dilakukan pengujian aktivitas dan mencari kondisi optimum aktivitasnya sehingga perlu dilakukan penentuan aktivitas optimum dari enzim ini. Berdasarkan hal inilah penulis ingin melakukan penelitian yang berjudul “**Penentuan Aktivitas Optimum Crude Inulinase dari Isolat Bakteri 55**”

B. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang diatas dapat dirumuskan permasalahan yaitu berapakah aktivitas optimum crude inulinase dari isolat bakteri 55 .

C. Pembatasan Masalah

Berdasarkan rumusan masalah yang telah dikemukakan, setiap bakteri memiliki aktivitas optimum inulinase yang berbeda-beda tergantung jenis bakteri dan kondisi berlangsungnya reaksi enzimatik. Oleh karena itu penulis membatasi permasalahan sebagai berikut:

1. Variasi suhu yang digunakan adalah 45, 50, 55, 60 dan 65° C.
2. Variasi pH yang digunakan adalah 4,5, 5, 5,5, 6 dan 6,5
3. Variasi konsentrasi substrat yang digunakan adalah 0,5%, 1%, 2%, dan 3 % b/v.
4. Waktu inkubasi selama 30 menit.

D. Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah:

1. Menentukan aktivitas optimum crude inulinase dari isolat bakteri 55 pada variasi pH, suhu dan konsentrasi substrat.
2. Menentukan nilai K_M dan V_{maks} crude inulinase dari isolat bakteri 55.

E. Manfaat Penelitian

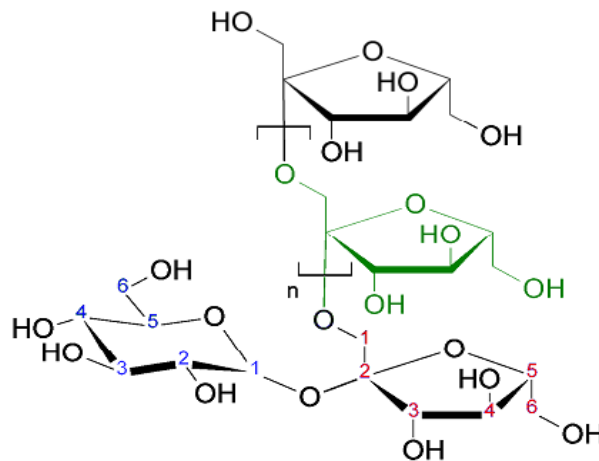
Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi aktivitas optimum crude inulinase dari isolat 55 bakteri penghasil inulinase dengan variasi pH, suhu dan konsentrasi substrat.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Inulin

Inulin merupakan polimer kelompok karbohidrat alamiah dari unit-unit fruktosa. Inulin pertama kali diisolasi oleh seorang ilmuwan Jerman yang bernama Rose tahun 1804. Isolasi inulin dilakukan dengan cara mengekstrak *Innula hellium*. Nama inulin pertama sekali digunakan oleh Thomson pada tahun 1811 yang diturunkan dari nama genus "inula" (Alant) dari keluarga bunga matahari. Inulin merupakan senyawa polifruktan yang memiliki ikatan linier β 2,1-polifruktan dengan satu unit terminal glukosa pada rantai ujung (Carpita N, 1991)



Gambar 1. Struktur inulin
(Ekadini, 2009)

Inulin sedikit larut dalam air dingin dan pada suhu rendah inulin akan mengendap. Inulin dapat mengendap dalam campuran etanol dan air (Vandamme dan Derycke, 1983). Inulin dapat terhidrolisis oleh asam pada suhu tinggi (70° C - 80 °C)

dan oleh mikroba penghasil inulinase menjadi fruktosa ataupun oligosakarida (Fleming and Grootwasink, 1979).

Satu rantai inulin berupa rantai lurus dari residu fruktosa yang dihubungkan dengan ikatan glikosida. Panjang rantai biasanya terdiri dari 25-35 residu (Alians dkk, 1986). Inulin terdapat pada umbi dahlia (*Dahlia sp.*), umbi Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*), chicory (*Chicoryum intybus L*), dandelion (*Taraxacum officinale Weber*), umbi yacon (*Smallanthus sanchifolius*), dan dalam jumlah kecil terdapat di dalam bawang merah, bawang putih, asparagus, pisang, dan gandum.

Hidrolisis sempurna inulin menggunakan enzim dapat menghasilkan banyak fruktosa dan sedikit glukosa. Fruktosa dikenal sebagai levulosa, dimana secara kimia strukturnya hampir sama dengan glukosa, tetapi letak (susunan) atom – atom didalam molekulnya sedikit berbeda. Fruktosa merupakan sumber pemanis alami alternative yang aman bagi kesehatan. Fruktosa memiliki tingkat kemanisan 1,7 kali dibandingkan dengan sukrosa (Tabel 1).

Tabel 1. Tingkat kemanisan relatif beberapa jenis monosakarida:

No	Monosakarida	Tingkat kemanisan Relatif
1.	Fruktosa	170
2.	Gula Invert (campuran glukosa dan fruktosa)	130
3.	Sukrosa	100
4.	Glukosa	75
5.	Maltosa	30
6.	Galaktosa	30
7.	Laktosa	15

(Sreeranjit, 1993)

B. Aktivitas Inulinase

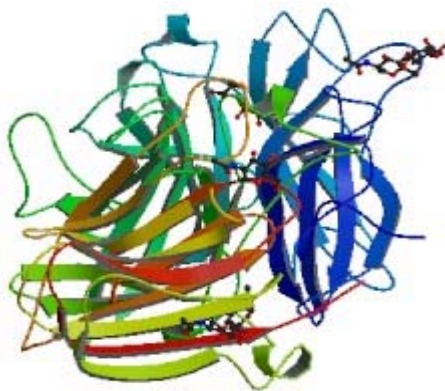
Enzim merupakan golongan protein yang disintesis oleh sel hidup dan mempunyai fungsi penting sebagai katalisator dalam setiap reaksi metabolisme yang terjadi pada organisasi hidup. Enzim juga dikenal sebagai biokatalisator pada berbagai proses industri. Hal ini disebabkan enzim mempunyai efisiensi dan efektifitas yang tinggi, reaksinya tidak menimbulkan produk samping, serta dapat digunakan berulang kali dengan teknik amobilisasi (Lehninger, 1995).

Inulinase termasuk kelompok enzim hidrolase yang bekerja sebagai katalis pada reaksi hidrolisis. Enzim ini dapat mengkatalis reaksi hidrolisis ikatan glikosida antara fruktosa pada inulin (Rusdi, 2006). Enzim menghidrolisis inulin menjadi fruktosa pada posisi terminal β -2,1 (Sri asih, 2009).

Aktivitas inulinase didefinisikan sebagai kemampuan inulinase dalam menghidrolisis inulin menjadi 1 μ mol fruktosa permenit pada kondisi tertentu (Sri Asih, 2009). Satu unit inulinase adalah jumlah inulinase yang mampu mengkatalisis perubahan 1 μ mol fruktosa permenit pada kondisi tertentu (Winarno, 1995) Dalam proses pemutusan ikatan, kerja inulinase dibagi dua yaitu Ekso-inulinase dan Endo-inulinase. Ekso-inulinase memutus ikatan glikosida pada inulin menjadi unit-unit fruktosa. Endo-inulinase memutus ikatan glikosida pada inulin menjadi fruktooligosakarida (fruktosa dalam bentuk oligosakarida) sebagai produk utamanya (Nakamura, dkk.1995).

Ekso-inulinase yang telah ditemukan struktur tersiernya sampai saat ini adalah berasal dari *Aspergillus Awamory* dengan penomoran enzim EC. 3.2.1.80. Pusat aktif inulinase dari *Aspergillus awamory* adalah Asp 41, Glu 241 dengan bagian untuk

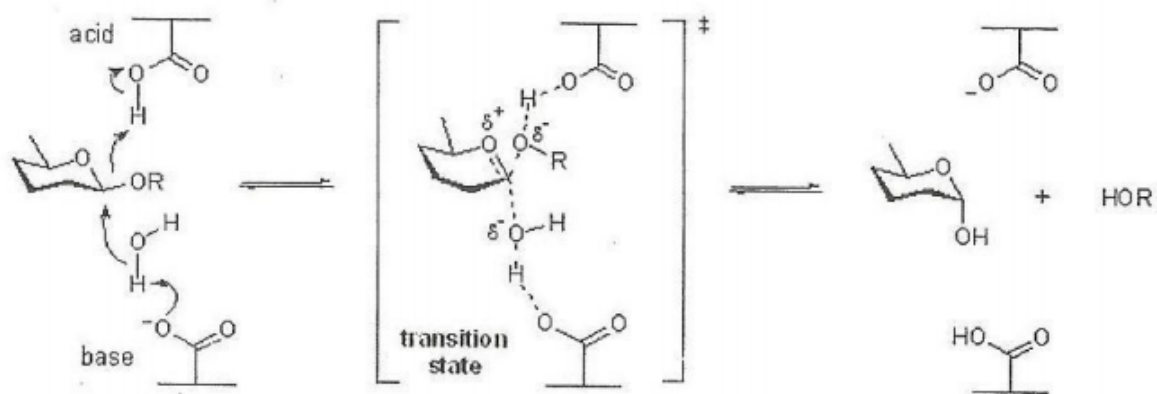
mengenal substrat adalah Asp 189 (Nagem, 2004). Struktur tersier inulinase dari *Aspergillus awamory* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur tersier inulinase dari *Aspergillus awamory* (Nagem, 2004)

Mekanisme yang terjadi merupakan mekanisme inversi β -glikosida. Hal ini disebabkan karena inulinase menghidrolisis inulin menjadi fruktosa pada ikatan β -2,1-polifruktan. Mekanisme inversi mengikuti reaksi SN_2 . Pada reaksi ini nukleofil menyerang dari sisi belakang. Pada mekanisme ini terjadi proses serempak yaitu tahap pembentukan ikatan dan pemutusan ikatan terjadi secara bersamaan (Fessenden, 1986). Hidrolisis ikatan glikosida oleh inulinase dikatalis oleh dua residu asam amino di posisi Asp 41 dan Glu 241 pada Exo-inulinase dari *Aspergillus awamory*. Kedua gugus ini berperan sebagai gugus asam (donor proton) dan gugus basa sebagai nukleofil. Mekanisme reaksi ini dapat dilihat pada Gambar 3.

Inverting mechanism for a β -glycosidase:



Gambar 3. Mekanisme reaksi hidrolisis ikatan glikosida pada inulin
(www.Cazypedia.com)

Pada reaksi diatas terlihat gugus amino yang berperan sebagai nukleofil menyerang salah satu atom H pada H_2O . Nukleofil ^-OH yang terbentuk menyerang atom C pada monosakarida yang berikatan β -glikosida terhadap monosakarida lainnya. Sejalan dengan itu, nukleofil ^-OR yang terbentuk menyerang atom H pada gugus amino yang berperan sebagai asam sehingga gugus amino ini dapat mendonorkan protonnya dan terbentuklah monosakarida baru.

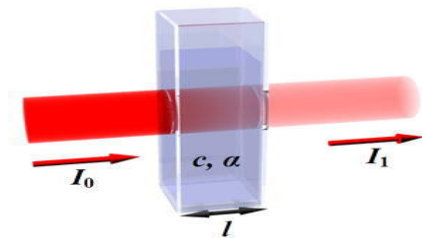
Inulinase memiliki aktivitas optimum. Aktivitas optimum inulinase merupakan keadaan tertentu dari inulinase yang menyebabkan kerja enzim maksimal. Aktivitas optimum ini dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi substrat, konsentrasi enzim, suhu, pH dan waktu inkubasi (Rusdi, 2006).

Bakteri rata-rata memiliki suhu dan pH optimum yang lebih besar dari ragi dan jamur. Suhu dan pH optimum aktivitas bakteri *Geobacillus stearothermophilus* yaitu 60°C dan 6,0 (Tsujimoto. *et. al.* 2003). Pada bakteri *Pseudomonas*

mucidolens memiliki pH 6,0 dan suhu 55° C untuk aktivitas optimumnya (Kwon .et.al. 2000).

C. Spektrofotometer Visibel

Spektrofotometri merupakan suatu metoda analisa yang didasarkan pada pengukuran serapan sinar monokromatis oleh suatu lajur larutan berwarna pada panjang gelombang spesifik. Spektrofotometer adalah alat untuk mengukur transmittan atau absorban suatu sampel (Saputra, 2009). Metoda pengukuran menggunakan spektrofotometer disebut dengan spektrofotometri. Absorbansi sampel diukur pada berbagai panjang gelombang dan menghasilkan spektrum tertentu untuk komponen yang berbeda. Absorbansi sinar oleh larutan mengikuti hukum Lambert-Beer, yaitu:



Gambar 4. Hukum Lambeert-Beer
(Saputra, 2009)

$$A = \log (I_0 / I_t) = a b c$$

Keterangan :

I_0 = Intensitas sinar datang

I_t = Intensitas sinar yang diteruskan

a = Absorptivitas

b = Panjang sel/kuvet

c = konsentrasi (g/l)

A = Absorban

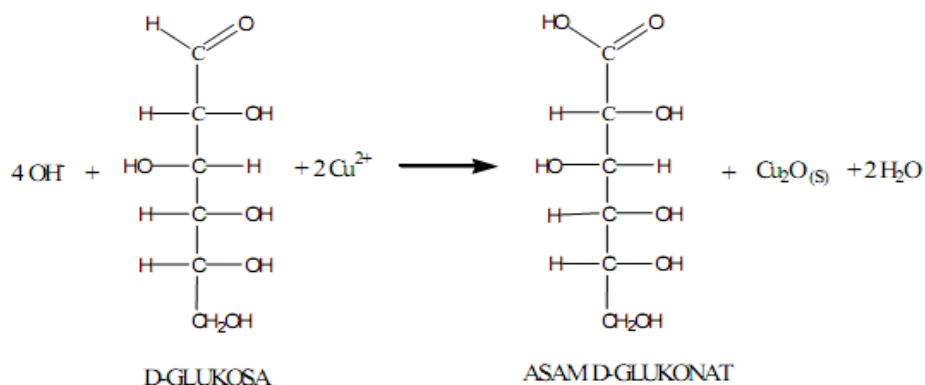
Pada spektrofotometer Visibel yang digunakan sebagai sumber sinar/energi adalah cahaya tampak (visible). Cahaya visible termasuk spektrum elektromagnetik yang dapat ditangkap oleh mata manusia. Panjang gelombang sinar tampak adalah 380 sampai 750 nm.

Sumber sinar tampak yang umumnya dipakai pada spektro visible adalah lampu *Tungsten*. Tungsten yang dikenal juga dengan nama *Wolfram* merupakan unsur kimia dengan simbol W dan no atom 74. Tungsten mempunyai titik didih yang tertinggi (3422 °C) dibanding logam lainnya. karena sifat inilah maka ia digunakan sebagai sumber lampu. Sample yang dapat dianalisa dengan metode ini hanya sample yang memiliki warna. Oleh karena itu, untuk sample yang tidak memiliki warna harus terlebih dulu dibuat berwarna dengan menggunakan reagent spesifik yang akan menghasilkan senyawa berwarna. Reagent yang digunakan harus betul-betul spesifik hanya bereaksi dengan sampel yang akan dianalisa. Selain itu juga produk senyawa berwarna harus stabil.

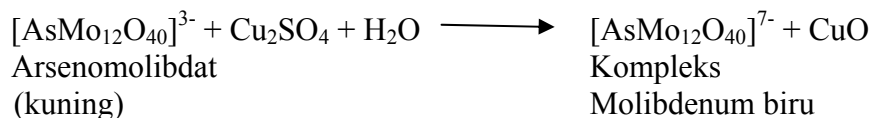
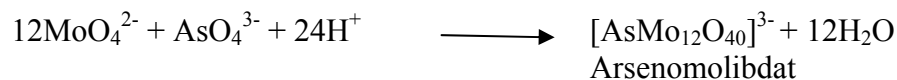
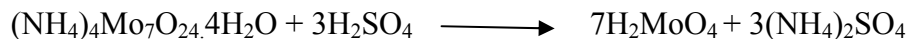
Pengukuran absorbansi fruktosa akibat dari aktivitas inulinase ini menggunakan reagen Arsenomolibdat sebagai reaksi pewarnaan spesifik. Dengan adanya reagen ini, sampel dapat diukur pada daerah sinar tampak (visible) karena reagen ini berfungsi sebagai pemberi warna pada sampel yang akan dianalisa. Metoda yang digunakan untuk menentukan konsentrasi gula pereduksi dalam sampel adalah metoda Nelson-Somogy.

Metode ini melibatkan dua tahap reaksi yaitu reaksi D-glukosa dengan pereaksi Nelson menghasilkan produk Cu_2O berupa endapan merah bata. Kemudian reaksi kedua adalah antara Cu_2O dengan pereaksi arsenomolibdat. Gula pereduksi adalah suatu gula yang mengandung gugus aldehyd atau suatu gugus α -hidrosiketon (Fessenden, 1982). Dalam pengujian ini, gula pereduksi yaitu D-glukosa bereaksi dengan ion Cu^{2+} membentuk asam D-Glukonat dan endapan Cu_2O yang berwarna merah bata. Kemudian Cu_2O dalam bentuk Cu_2SO_4 akan bereaksi dengan reagen arsenomolibdat ($[\text{AsMo}_{12}\text{O}_{40}]^{3-}$) membentuk kompleks molibdenum ($[\text{AsMo}_{12}\text{O}_{40}]^{7-}$) yang berwarna biru (Diah, 2007). Persamaan reaksi dapat dilihat pada Gambar 5:

Tahap 1:

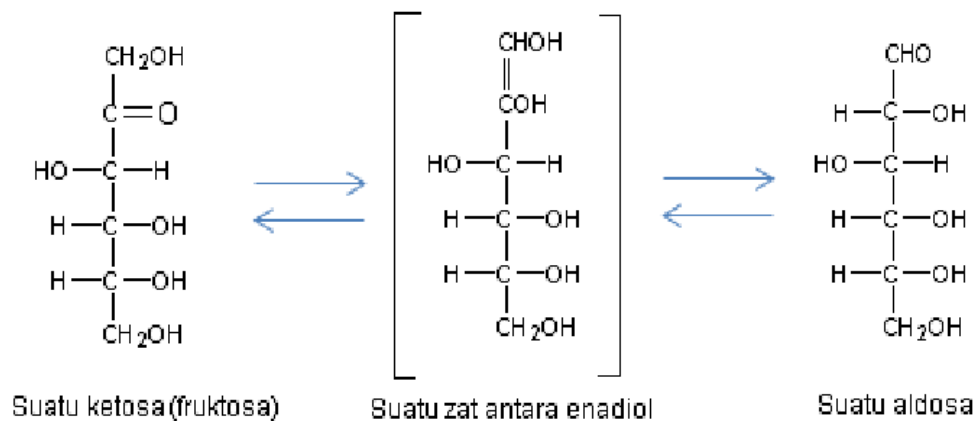


Tahap 2:



Gambar 5. Reaksi D-Glukosa dengan reagen Arsenomolibdat

Fruktosa merupakan gula pereduksi meskipun berupa suatu keton. Fruktosa mudah teoksidasi karena dalam larutan basa fruktosa berada dalam kesetimbangan dengan dua aldehida diastomerik serta penggunaan suatu zat antara tautomerik enadiol (Fessenden,1982). Hal inilah yang menyebabkan konsentrasi fruktosa dalam sampel dapat di tentukan dengan metode Nelson-Somogy.



Gambar 6. Reaksi kesetimbangan fruktosa membentuk aldehida diastomerik. (Fessenden, 1982)

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan yang telah dikemukakan, maka dapat disimpulkan:

1. Aktivitas crude inulinase dari isolat bakteri 55 optimum pada pH 5, suhu 55° C dan 1% b/v konsentrasi substrat.
2. Crude inulinase dari isolat bakteri 55 memiliki nilai K_M sebesar 0,28 % b/v dan V_{maks} sebesar 40 U/mL.

B. Saran

Dari penelitian yang telah dilakukan, disarankan untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

1. Penentuan aktivitas crude inulinase dari isolat 55 dengan variasi konsentrasi enzim dan waktu inkubasi
2. Melakukan pemurnian crude inulinase dari isolat 55 menggunakan kromatografi kolom dan elektroforesis.

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.
- Alexander, Renee R. and Joan M. Griffiths. 1993. “ *Basic Chemical Methods.*” A Jhon Willey and Sons. Inc. Publication : New York.
- Allais, J.J., G. Hoyos-Lopez, S. Kammoun And J.Baratti. 1986. “*Isolation and Characterization of ThermoPhilic Bacterial Strain With Inulinase Activity.*” Appl. Environ. Microbial. 53 (5) : 942-945.
- Asih, Sri. 2006. “*Pemanfaatan Aspergillus clavatus pada Produksi Fruktooligosakarida dari Umbi Dahlia sebagai Sumber Prebiotik Susu Formula Balita.*” Bogor : IPB
- Carpita, N, Housley TL, Hendrix JE. 1991. “*New features of plant-fructan structure revealed by methylation analysis and carbon-13 N.M.R. spectroscopy.*” Carbohydrate Research 217:127-136
- Diah, Athiya N. M. 2007. “ *Studi Aktivitas Spesifik Selulase dari Lactobacillus collinoides yang Dimurnikan dengan Pengendapan Bertingkat Amonium Sulfat.*”. Universitas Brawijaya : Malang.
- Ekadini, Astrid Idrajati. 2009. “*Produksi Sirup FOS (Fruktooligosakarida) dari Tepung Inulin secara Hidrolisis Asam.*” Bogor:ITB
- Fessenden, Ralp. J. and Joans Fessenden. 1986. “*Organik Chemistry Third Edition.*” Walsworth. Inc. Belmonth. California USA.
- Flamming, S. E., and J. W. D. Grootwassink. 1979. “*Preparation of high fructose syrup from the tubers of the Jarussaleem artichoke (Heliantus tuberosus. L.).*” Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 12: 1-28
- Forgaty, W.M. 1983. *Microbial Enzymes and Biotechnology*. London: Appl.Sci.
- Kang SI, Chang YJ, Oh SJ, Kim SI. (1998). “*Purification and properties of an endo-inulinas e from an Arthrobacter sp.*” Biotechnol Lett 20:983 –986.
- Kukun. 2004. “*Dahlia, cantik bunganya, manis umbinya.*” [http:// kukun10blogspot.com](http://kukun10blogspot.com). diakses tanggal 3 oktober 2010.
- Kwon YM, Kim HY, Choi YJ (2000) “*Cloning and characterization of Pseudomonas mucidolens exoinulinase.*” J Microbiol Biotechnol 10(2):238 – 243