

**PENENTUAN MASSA MOLEKUL DAN AKTIVITAS ENZIM
INULINASE MURNI PARSIAL DARI BAKTERI
*RIZOSFER UMBI Dahlia sp.***

SKRIPSI

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



Oleh:

SYAMSI KHAIRANI

NIM/BP: 14036043/2014

PROGRAM STUDI KIMIA

JURUSAN KIMIA

FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM

UNIVERSITAS NEGERI PADANG

2018

PERSETUJUAN SKRIPSI

PENENTUAN MASSA MOLEKUL DAN AKTIVITAS ENZIM
INULINASE MURNI PARSIAL DARI BAKTERI
RIZOSFER UMBI Dahlia sp.

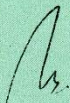
Nama : Syamsi Khairani
Nim : 14036043
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

Padang, Juli 2018

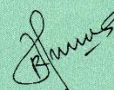
Disetujui Oleh:

Pembimbing I

Pembimbing II



Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si
NIP. 196411241991122001



Dra. Iryani, M.S
NIP. 19620113 198603 2 001

PENGESAHAN LULUS UJIAN SKRIPSI

Nama : Syamsi Khairani
NIM : 14036043
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam

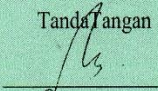

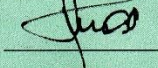

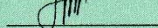
dengan judul

**PENENTUAN MASSA MOLEKUL DAN AKTIVITAS ENZIM
INULINASE MURNI PARSIAL DARI BAKTERI
*RIZOSFER UMBI Dahlia sp.***

Dinyatakan lulus setelah dipertahankan didepan Tim Penguji Skripsi
Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Negeri Padang

Padang, Juli 2018

Tim Penguji

	Nama	Tanda Tangan
Ketua	: Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si	
Sekretaris	: Dra. Iryani, M.S	
Anggota	: Drs. Iswendi, M.S	
Anggota	: Ananda Putra, M.Si, Ph.D	
Anggota	: Hary Sanjaya, M.Si	

SURAT PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini.

Nama : Syamsi Khairani
TM/NIM : 14036043/2014
Tempat/Tanggal Lahir : Curup / 23 Oktober 1995
Program Studi : Kimia
Jurusan : Kimia
Fakultas : MIPA
Alamat : Curup, Bengkulu
No.HP/Telepon : 081267122833
Judul Skripsi : Penentuan Massa Molekul dan Aktivitas Enzim
Inulinase Murni Parsial dari Bakteri *Rizosfer Umbi
Dahlia* sp.

Dengan ini saya menyatakan bahwa.

1. Karya tulis/skripsi ini adalah hasil karya saya sendiri dan belum pernah diajukan untuk memperoleh gelar baik di UNP maupun perguruan tinggi lainnya.
2. Karya tulis/skripsi ini murni gagasan, rumusan dan penelitian saya sendiri tanpa bantuan pihak lain kecuali arahan tim pembimbing dan penguji skripsi.
3. Pada karya tulis/skripsi ini tidak terdapat karya atau pendapat yang telah ditulis atau dipublikasikan orang lain kecuali tertulis dengan jelas dicantumkan pada daftar pustaka.
4. Karya tulis/skripsi ini sah apabila telah ditandatangani Asli oleh tim pembimbing dan tim penguji

Pernyataan ini saya buat dengan sungguh-sungguh. Apabila dikemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran di dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima **Sanksi Akademik** berupa pencabutan gelar akademik dan sanksi lainnya sesuai dengan norma yang berlaku di perguruan tinggi.

Padang, Juli 2018
yang membuat pernyataan,



Syamsi Khairani
NIM : 14036043

ABSTRAK

Syamsi Khairani, 2018 : Penentuan Massa Molekul dan Aktivitas Enzim Inulinase Murni Parsial dari Bakteri *Rizosfer Umbi Dahlia* sp.

Inulinase dari bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp 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 inulinase murni parsial pada variasi pH (3 ; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 6,0; dan 7,0), suhu (20°C; 30°C; 37°C; 40°C dan 50,0°C), dan konsentrasi substrat (1,0% ; 1,25% ; 1,5% ; 1,75% ; 2,0.% 2,25%; 2,5%; dan 3,0%) dengan waktu inkubasi 30 menit. Selain itu, juga dilakukan penentuan nilai K_M dan V_{maks} serta massa molekul dari inulinase murni parsial. Aktivitas inulinase ditentukan dengan metoda Nelson-Samogyi pada λ_{maks} 500 nm. Nilai K_M dan V_{maks} ditentukan melalui persamaan Michaelis-Menten dan persamaan Lineweaver-Burk. Massa molekul ditentukan dengan metoda SDS-PAGE. Aktivitas optimum inulinase yang diperoleh adalah 0.0748 U/mL pada pH 5,0 ; suhu 40°C dan konsentrasi substrat 2,25%. Nilai K_M dan V_{maks} inulinase adalah 4.884 % (w/v) dan 22.3×10^{-2} U/mL. Inulinase yang diperoleh massa molekulnya berukuran sekitar ~43 KDa.

Kata kunci: inulin, inulinase, aktivitas, SDS-PAGE, fruktosa.

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya serta sholawat dan salam kepada nabi Muhammad SAW sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul **“Penentuan Massa Molekul dan Aktivitas Enzim Inulinase Murni Parsial dari Bakteri *Rizosfer Umbi Dahlia* sp”**. Skripsi ini diajukan untuk melengkapi dan memenuhi persyaratan mata kuliah Tugas Akhir 2 sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana sains pada program studi Kimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang.

Penulisan skripsi ini tidak terlepas dari bantuan, bimbingan, petunjuk, arahan, dan masukan yang berharga dari beberapa pihak. Berdasarkan hal ini, dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada

1. Ibu Prof. Dr. Minda Azhar, M.Si selaku dosen pembimbing I.
2. Ibu Dra. Iryani, M.S selaku dosen pembimbing II.
3. BN3P Universitas Negeri Padang yang telah telah mendanai riset ini.
4. Tim riset Biokimia Institut Teknologi Bandung
5. Bapak Drs. Iswendi, M.S., Bapak Ananda Putra, Ph.D, dan Bapak Hary Sanjaya, M.Si selaku dosen pembahas dan penguji skripsi jurusan Kimia FMIPA UNP.
6. Orang tua penulis Mefrizal dan Afrida, S.Pd dan keluarga tercinta.
7. Staf laboratorium jurusan Kimia FMIPA UNP.
8. Tim riset Biokimia FMIPA UNP

9. Sahabat- sahabat tercinta.

10. Mahasiswa jurusan Kimia FMIPA UNP

Skripsi ini telah ditulis dan dibuat dengan sebaik-baiknya, namun untuk kesempurnaan skripsi ini, diharapkan kritik dan saran yang membangun dari semua pihak. Atas kritik dan saran penulis mengucapkan terima kasih.

Padang, Juli 2018

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
ABSTRAK	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
BAB I PENDAHULUAN	1
A. Latar Belakang.....	1
B. Identifikasi Masalah	3
C. Batasan Masalah	4
D. Rumusan Masalah.....	4
E. Tujuan Penelitian	5
F. Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
A. Inulin.....	6
B. Bakteri pendegradasi inulin dari <i>rizosfer</i> umbi <i>Dahlia</i> sp.....	8
C. Inulinase.....	10
D. Aktivitas optimum enzim pendegradasi inulin.....	13
E. Pemurnian parsial enzim inulinase dengan Amonium sulfat	15
F. Penentuan massa molekul inulinase dengan SDS-PAGE.....	17
BAB III METODE PENELITIAN	19
A. Waktu dan Tempat.....	19
B. Objek penelitian.....	19
C. Alat dan Bahan	19
D. Prosedur Penelitian	20
E. Prosedur Kerja	22
F. Teknik Analisa Data	25
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	26
A. Deskripsi Data	26
B. Pembahasan	29

BAB V PENUTUP	39
A. Simpulan.....	39
B. Saran.....	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	45

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Struktur Inulin.....	6
2. Rizosfer Umbi Dahlia sp.....	9
3. Aksi Exo-inulinase dan Endo-inulinase	11
4. Struktur tersier inulinase dari <i>Aspergillus awamory</i>	12
5. Struktur DNS	14
6. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS	15
7. Kurva Standar Larutan Fruktosa.....	26
8. SDS-PAGE inulinase; M: Marker, U3: Inulinase murni parsial, U2: Pengendapan ammonium sulfat, U1: Ekstrak kasar.	27
9. Grafik aktivitas optimum inulinase pada variasi pH dengan konsentasi substat 1% dan suhu 37°C.....	27
10. Grafik aktivitas optimum inulinase pada variasi suhu dengan konsentasi substat 1% dan pH 5	27
11. Grafik aktivitas inulinase pada variasi konsentrasi substrat inulin dengan pH 5 dan suhu 40°C.....	28
12. Single koloni isolat bakteri UKG di media padat	30
13. Kontrol negatif (a) Kultur bakteri UKG (b).....	31
14. Kurva pemetaan Lineweaver-Burk yang menggambarkan harga K_M dan V_{mak} inulinase dari isolat UKG	38

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Sumber inulin dari berbagai tumbuhan	8
2. Tabel penambahan Ammonium Sulfat.....	17
3. Komposisi pembuatan buffer asetat pada berbagai pH.....	21
4. Komposisi pembuatan buffer fosfat pada berbagai pH.....	21
5. Absorbansi larutan standar fruktosa pada λ 500 nm	65
6. Absorbansi pada penentuan aktivitas inulinase menggunakan variasi pH (suhu 37°C).....	65
7. Absorbansi pada penentuan aktivitas Inulinase menggunakan variasi suhu (pH 5).....	65
8. Absorbansi pada penentuan aktivitas inulinase menggunakan variasi konsentrasi substrat (pH 5 dan suhu 40°C).....	66
9. Aktivitas Inulinase pada Variasi pH	66
10. Aktivitas Inulinase pada Variasi Suhu	66
11. Aktivitas Inulinase pada Variasi Konsentrasi Substrat	67

BAB I

PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Pemanfaatan enzim di berbagai industri semakin berkembang, baik industri pangan maupun industri nonpangan. Enzim merupakan katalisator yaitu suatu protein yang mempunyai daya katalitik sehingga dapat mempercepat reaksi. Sebagai suatu katalisator penggunaan enzim memiliki peranan yang sangat besar dalam berbagai bidang industri. Bekerja dengan enzim jauh lebih efektif dibandingkan tanpa penggunaan enzim (Azhar, 2009). Hal ini menyebabkan banyak industri memilih menggunakan enzim dalam proses produksinya. Industri pembuatan sirup merupakan salah satu industri yang memanfaatkan enzim inulinase untuk mengkatalis reaksi hidrolisis inulin menghasilkan fruktooligosakarida (FOS) dan fruktosa (Gao *et al.*, 2008).

Fruktosa dan FOS adalah produk biokonversi inulin dengan bantuan inulinase 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). FOS juga merupakan bahan yang sangat 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).

Fruktosa dapat dihasilkan dengan cara menghidrolis inulin menggunakan enzim inulinase dan enzim levanase. Oleh karena itu perlu dilakukan uji pendahuluan terhadap enzim yang bersumber dari bakteri *rizosfer* umbi dahlia untuk membuktikan bahwa enzim yang dihasilkan levanase atau inulinase. Uji pendahuluan dilakukan dengan cara mempertemukan enzim dari bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp dengan substrat inulin dan levan. Berdasarkan uji pendahuluan didapatkan hasil bahwa enzim ini adalah inulinase karena ketika dipertemukan dengan inulin terbentuklah produk berupa gula pereduksi yang terdeteksi oleh reagen asam dinitro salisilat (DNS). Sedangkan ketika enzim dari bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp dipertemukan dengan substrat levan tidak terdeteksi adanya gula pereduksi dengan reagen DNS.

Inulinase yang digunakan diisolasi dari bakteri yang terdapat pada *rizosfer* umbi *Dahlia* sp. Bakteri tersebut diberi substrat inulin untuk menghasilkan inulinase. Inulinase yang dihasilkan melalui proses pengendapan menggunakan ammonium sulfat dan dialisis. Hasil pengendapan dan dialisis adalah enzim inulinase yang lebih pekat dari enzim kasar sehingga disebut dengan enzim inulinase murni parsial. Enzim inulinase murni parsial ini yang akan ditentukan aktivitas dan massanya.

Pengecekan kemurnian suatu enzim sangat diperlukan dalam studi enzim, karena kemurnian enzim akan berbanding lurus dengan aktivitas enzim. Oleh karena itu dibutuhkannya perkiraan massa molekul dari enzim yang diteliti. Perkiraan massa molekul enzim dicek menggunakan SDS-PAGE. Massa molekul berfungsi sebagai acuan untuk mengecek kemurnian enzim. Massa molekul enzim juga berguna sebagai referensi bagi para peneliti bahwa enzim yang dihasilkan memang benar inulinase.

Inulinase yang berasal dari sumber yang berbeda akan menghasilkan aktivitas enzim yang berbeda pada pH, suhu dan konsentrasi substrat tertentu. Aktivitas optimum inulinase dan *Bacillus polymyx* adalah pada pH 7, suhu 35 °C dengan ukuran 58 KDa , dari *B.smithii* pada pH 4,5 , suhu 70°C dengan ukuran 47 KDa. Inulinase dari *Bifidobacterium infantis* mempunyai aktivitas optimum pada pH 6, suhu 37 °C dengan ukuran 70 KDa. Inulinase dari *Pseudomonas mucidolens* optimum pada pH 6 dan suhu 55 °C yang berukuran 55 KDa (Kango dan Jean, 2011). Inulinase yang dihasilkan dari sumber yang sama dengan daerah asal yang berbeda, akan mempunyai pH, suhu, dan konsentrasi substrat optimum yang berbeda (Saryono, 2008). Oleh sebab itu penulis tertarik menentukan aktivitas optimum inulinase murni parsial sekaligus memperkirakan massa molekul inulinase yang dihasilkan dari bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp. Aktivitas optimum dan massa molekul inulinase murni parsial dari bakteri yang terdapat pada *rizosfer* umbi *Dahlia* sp dari daerah Padang Panjang belum pernah dilaporkan. Oleh sebab itu penulis melakukan penelitian yang berjudul **“Penentuan Massa Molekul dan Aktivitas Enzim Inulinase Murni Parsial dari Bakteri *Rizosfer* Umbi *Dahlia* sp”**.

B. Identifikasi Masalah

Pada penelitian ini, dapat diidentifikasi beberapa masalah sebagai berikut:

1. Enzim inulinase yang berasal dari sumber yang berbeda akan menghasilkan aktivitas optimum yang berbeda pula, sehingga enzim inulinase yang dihasilkan dari bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp ini perlu ditentukan kondisinya untuk mendapatkan aktivitas besar.

2. Aktivitas enzim akan semakin besar seiring dengan meningkatnya kemurnian enzim, namun enzim inulinase dari *rizosfer* umbi *Dahlia* sp ini belum pernah dimurnikan secara parsial.
3. Massa molekul berguna untuk mengidentifikasi dan menambah informasi tentang suatu enzim, namun enzim inulinase bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp dari Padang Panjang belum pernah ditentukan berapa massa molekul nya.
4. Pengendapan enzim dapat dilakukan menggunakan etanol dan ammonium sulfat, namun pengendapan dengan etanol menyebabkan inulin pada media pertumbuhan ikut mengendap.

C. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini yaitu sebagai berikut :

1. Enzim inulinase yang ditentukan massa molekul nya bersumber dari bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp koleksi Laboratorium Biokimia UNP yang berasal dari daerah Padang Panjang .
2. Variabel yang diteliti adalah aktivitas optimum enzim inulinase murni parsial pada variasi konsentrasi substrat, suhu, pH, dan waktu inkubasi 30 menit.
3. Enzim diendapkan dengan ammonium sulfat.

D. Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah berapa massa molekul dan bagaimana aktivitas enzim inulinase murni parsial dari isolate bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp ?

E. Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini ialah:

1. Menentukan massa molekul inulinase murni parsial dari isolate bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp.
2. Menentukan aktivitas optimum inulinase murni parsial dari isolate bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp pada variasi pH, suhu dan konsentrasi inulin.

F. Manfaat Penelitian

Manfaat yang diperoleh dari penelitian ini ialah:

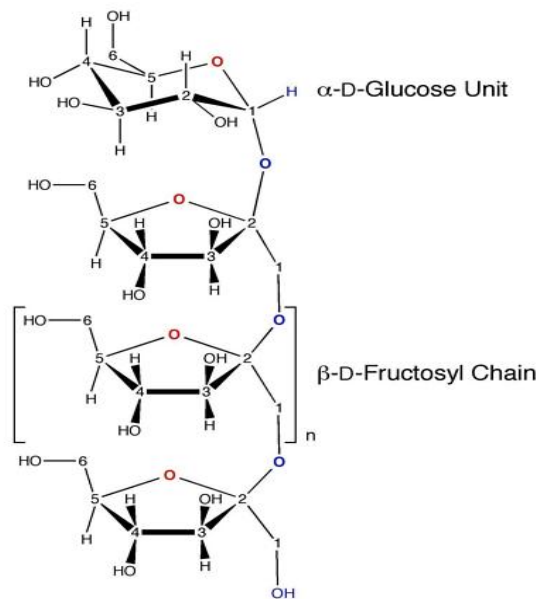
1. Memperoleh inulinase murni parsial dari isolate bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp.
2. Memberikan informasi tentang aktivitas optimum inulinase murni parsial dari isolat bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp.
3. Memberikan kontribusi dalam pengembangan ilmu dan teknologi tentang aktivitas optimum inulinase murni parsial dari *rizosfer* umbi *Dahlia* sp.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

A. Inulin

Inulin adalah suatu polifruktan yang tersusun atas molekul linier D-fruktofuranosa dengan ikatan β -2-1-glikosida dan memiliki gugus terminal D-glukosa yang berikatan dengan fruktosa melalui ikatan α -1-2-glikosida. Inulin merupakan kelompok karbohidrat yang banyak terdapat pada tanaman *compositae*, seperti *Jerusalem artichoke*, *Chicory*, dan *Dahlia*. Inulin memiliki derajat polimerisasi (DP) lebih dari 30 yang diawali oleh satu molekul glukosa (Gupta, 1992). Struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Struktur Inulin
(Öztürk dan Serdaroğlu, 2016)

Inulin terdiri dari fruktosa dan tiap ujung pereduksi untai polimer inulin terdapat glukosa dikenal dengan GF_n. G menunjukkan unit glukosa terminal, F menunjukkan unit fruktosa dan n menunjukkan jumlah unit fruktosa yang ditemukan

dalam satu rantai fruktan. Oleh karena itu GFn adalah fruktan yang mempunyai ujung glukosa dan Fn adalah fruktan tanpa ujung terminal glukosa (Azhar, 2009).

Inulin mudah larut dalam air panas tetapi sukar larut dalam air dingin dan pelarut organik. Inulin berbentuk serbuk putih yang tidak berbau dan bersifat higroskopik (Vandamme *and* Derycke, 1983). Inulin secara luas digunakan dalam industri makanan dengan berbagai tujuan. Inulin digunakan sebagai pemanis rendah kalori, untuk pembuatan gel, menambah kekentalan, memperbaiki cita rasa, dan sebagai prebiotik (Mensink *et al.*, 2015).

Inulin mempunyai fungsi penting untuk memelihara kesehatan usus besar karena inulin adalah prebiotik. Hidrolisis inulin menghasilkan fruktosa dan fruktooligosakarida. Fruktooligosakarida adalah suatu oligosakarida yang tidak dapat dicerna oleh usus manusia namun sangat baik untuk menjaga kestabilan flora normal usus dan juga berperan sebagai serat yang larut (*soluble dietary fiber*) (Saryono, 2008). Senyawa polifruktan juga dapat berperan sebagai prebiotik dan memiliki sifat antikarsinogenik (Roberfroid *et al.*, 2007).

Inulin selain mempunyai fungsi penting untuk kesehatan tubuh, juga merupakan *raw material* untuk menghasilkan fruktosa sebagai sumber untuk produksi sirup fruktosa. Produksi fruktosa secara konvensional dari pati memerlukan tiga tahap reaksi enzimatik dengan rendemen hanya 45% . Fruktosa dari hidrolisis inulin hanya memerlukan satu tahap reaksi enzimatik dengan rendemen bisa mencapai 90-95%. Sirup fruktosa dapat digunakan sebagai pemanis rendah kalori karena fruktosa dua kali lebih manis dari sukrosa dengan organoleptik yang disukai (Nakamura *et al.*, 1995).

Sumber inulin banyak terdapat pada chicory (*Cichorium intybus*) dan Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus*) (Kaur & Gupta, 2002). Kandungan inulin pada setiap tumbuhan berbeda sesuai dengan jenisnya. Beberapa tumbuhan yang mengandung inulin adalah bawang, asparagus, umbi dahlia dan pisang (Karimi *et al.*, 2014). Sumber inulin dari berbagai tumbuhan dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Sumber inulin dari berbagai tumbuhan

Sumber inulin	Bagian pada tumbuhan	Kandungan inulin (% dari massa segar)
Bawang merah	Umbi	2-6
<i>Jerusalem artichoke</i>	Akar	14-16
Dahlia	Umbi	9-12,5
Chicory	Akar	15-20
Daun bawang	Umbi	3-10
Bawang putih	Umbi	9-16
Pisang	Buah	0,3-0,7
Gandum	Sereal	0,5-1
Barley	Sereal	0,5-1,5
Dendelion	Daun	12-15
Burdock	Akar	3,5-4
Camas	Umbi	12-22
Murnong	Akar	8-13
Yacon	Akar	3-19
Salsify	Akar	4-11

(Kango dan Jean, 2011)

B. Bakteri pendegradasi inulin dari rizosfer umbi *Dahlia* sp.

Bakteri adalah organisme uniseluler yang tidak memiliki inti sel dan berukuran 0,5-2 μm . Bakteri dapat hidup dan ditemukan pada kondisi yang ekstrim seperti suhu tinggi, pH yang tinggi atau rendah, lingkungan yang berkadar garam tinggi, atau tekanan yang sangat tinggi dimana organisme lain tidak dapat hidup. Kemampuan bakteri yang dapat hidup pada berbagai kondisi memiliki fungsi sangat

penting untuk mendapatkan bakteri potensial pendegradasi inulin pada *rizosfer* umbi *Dahlia* sp.

Rizosfer didefinisikan oleh Hiltner pada tahun 1904 adalah tanah yang melekat pada permukaan akar dan berfungsi sebagai perantara mikroorganisme ke pusat nutrisi tumbuhan (Bowen dan Rovira, 1999). Gambar *rizosfer* umbi *Dahlia* sp dimuat pada Gambar 2. *Rizosfer* dari tanaman yang kaya inulin bisa digunakan untuk mengisolasi bakteri pendegradasi inulin (Vandame dan Derycke, 1983). Bakteri yang terdapat pada *rizosfer* umbi *Dahlia* sp umumnya merupakan bakteri mesofilik. Bakteri mesofilik penghasil inulinase antara lain bakteri *Bacillus* sp, *Flavobacterium multivorum*, *Arthrobacter areofaciens* (Allais *et al.*, 1987).



Gambar 2. *Rizosfer* Umbi *Dahlia* sp.

(Sumber : <https://outofmyshed.co.uk/tag/are-dahlia-tubers-edible> diakses 23 April 2017)

Enzim inulinase dapat berasal dari tumbuhan dan mikroorganisme. Inulinase pada tumbuhan terdapat pada akar dan umbi akar, sedangkan pada mikroorganisme terdapat pada jamur, ragi, dan bakteri (Xiao *et al.*, 1988). Bakteri merupakan sumber terbaik untuk produksi inulinase karena mudah dibudidayakan dan enzim yang dihasilkan lebih banyak. Sejauh ini, telah ditemukan bakteri pendegradasi inulin

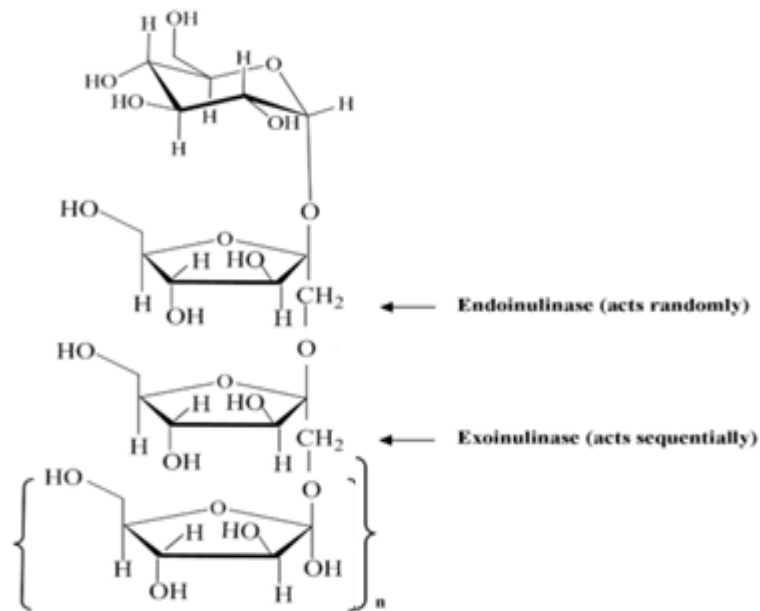
seperti *Bacillus spp*, *Clostridium spp*, *Pseudomonas spp*, *Arthrobacter spp*, *Staphylococcus spp* dan *Xanthomonas spp* (Gao, *et al.*, 2008). Dengan demikian, penggunaan inulinase dari bakteri telah diusulkan sebagai pendekatan yang paling menjanjikan untuk memperoleh fruktosa atau fructooligosakarida dari inulin (Mohamed *et al.*, 2015).

C. Inulinase

Snyder dan Phaff (1962) menyatakan bahwa inulinase adalah enzim ekstraseluler yang bekerja dengan aksi ekso dan endo, kemudian dikatakan juga bahwa inulinase adalah enzim penghidrolisis dan produk hasilnya berbentuk monosakarida. Kerja inulinase terhadap inulin menghasilkan D-fruktosa. Barker (1976) menyatakan bahwa fruktosa merupakan gula yang mempunyai nilai kemanisan tertinggi dibandingkan gula-gula komersial lainnya. Bila kristal fruktosa dan sukrosa dibandingkan, maka fruktosa 1.7-2.0 kali lebih manis dibanding sukrosa.

Salah satu cara untuk menghasilkan fruktosa yang efektif adalah dengan cara menghidrolis inulin menggunakan enzim inulinase (EC.3.2.1.7). Enzim inulinase adalah biokatalis menghidrolisis inulin menjadi fruktosa atau FOS. Fruktosa dan FOS diperoleh lebih praktis dari reaksi hidrolisis inulin secara enzimatik. Enzim ini termasuk *family* Glikosida Hydrolase (GH) 32.

Inulinase adalah enzim yang sangat penting. Enzim inulinase dibagi menjadi dua tipe aksi yaitu exoinulinase dan endoinulinase. Tipe aksi inulinase dapat dilihat pada Gambar 3. Aksi exoinulinase menghasilkan fruktosa dari makromolekul inulin sedangkan endoinulinase menghasilkan fructooligosakarida (FOS).

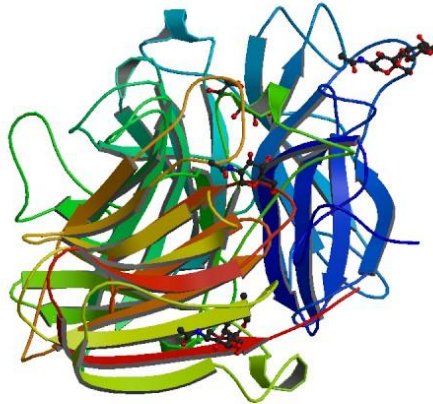


Gambar 3. Aksi Exo-inulinase dan Endo-inulinase
(Singh *et al.*, 2016)

Enzim inulinase pertama kali diisolasi dari tanaman yang mengandung inulin yaitu dari familia Compositae (Xiao *et al.*, 1988). Inulinase dapat diisolasi dari umbi tanaman *Jerusalem artichoke* dan akar *chicory* dan *dandelion*. Inulinase yang berasal dari tanaman memiliki aktivitas yang kecil. Sebaliknya, beberapa inulinase dari mikroba mempunyai aktivitas yang luar biasa (Vandamme dan Derycke, 1983). Enzim inulinase dapat berasal dari golongan jamur adalah *Aspergillus sp*, *Penicillium sp*, *Chrysosporium sp*, *Khamir (yeast) Kluyveromyces sp*, *Candida sp*, *Debaromyces* dan *Saccharomyces sp* dari golongan bakteri adalah *Arthrobacter sp*, *Flavobacterium sp* dan *Bacillus sp* (Allais *et al.*, 1987)

Inulinase merupakan protein globular. Protein ini memiliki tingkatan struktur primer, sekunder, dan tersier. Struktur primer merupakan urutan-urutan residu asam amino yang tersusun pada suatu polipeptida. Struktur sekunder adalah struktur tiga

dimensi lokal dari berbagai rangkaian asam amino pada protein yang distabilkan oleh ikatan hidrogen, sedangkan struktur tersier terjadi karena pelipatan struktur sekunder akibat adanya interaksi gugus rantai samping residu asam amino. Struktur tersier inulinase dari *Aspergillus awamory* dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Struktur tersier inulinase dari *Aspergillus awamory*
(Sumber : <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=1y4w> diakses pada 17 July 2017)

Sisi aktif inulinase mengandung residu asam amino yang berperan dalam pemutusan ikatan glikosida antar fruktosa dalam inulin (Basso, 2009). Syarat utama enzim bekerja pada substrat adalah terjadinya kontak antara enzim dengan substrat pada bagian tertentu. Bagian enzim yang mengadakan kontak dengan substrat dinamakan sisi aktif enzim. Kontak antara enzim dengan substrat dapat menyebabkan terjadinya kompleks enzim substrat yang bersifat sementara dan akan terurai lagi apabila reaksi yang diinginkan telah terjadi. Bagian aktif inulinase akan memutus ikatan β -2,1-fruktosida dari molekul inulin (Zharebtsou, 2003). Pemutusan ini akan membentuk kompleks enzim substrat yang kemudian direaksikan dengan air sehingga terbentuk fruktosa dan dihasilkan enzim kembali.

D. Aktivitas optimum enzim pendegradasi inulin

Aktivitas enzim dapat didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat mengkatalis pembentukan sejumlah produk (μmol) setiap menitnya pada kondisi reaksi tertentu. Aktivitas enzim dapat diukur dari pengurangan substrat. Enzim mempunyai aktivitas optimum pada pH dan suhu tertentu tergantung dari sumber enzim (Azhar, 2016).

Aktivitas optimum inulinase tergantung pada beberapa faktor diantaranya pH, suhu, konsentrasi substrat dan waktu inkubasi. Setiap enzim mempunyai pH optimum tertentu. Suhu, kecepatan reaksi meningkat seiring dengan kenaikan suhu hingga mencapai kondisi optimum. Konsentrasi substrat [S] yang digunakan serta waktu inkubasi yang ditentukan. Umumnya aktivitas inulinase yang dihasilkan berhubungan erat dengan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan, yaitu semakin tinggi aktivitas inulinase maka semakin banyak gula pereduksi yang dihasilkan. Menurut Sari (2005) aktivitas enzim inulinase dapat dihitung dengan rumus :

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

Keterangan: [X] = Jumlah gula pereduksi ($\mu\text{g/mL}$)

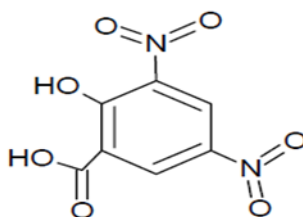
t = Waktu inkubasi (menit)

Mr Fruktosa = 180,1

Aktivitas optimum inulinase dari *Aspergillus niger* terjadi pada pH 4,3-4,4 dan suhu 45-60 °C, dari *Aspergillus niveus* pada pH 4,0 - 4,8 dari suhu optimum 45°C (Kango and Jean, 2011). Aktivitas optimum inulinase dari *Candida kefyr* terjadi pada pH 4,5 dengan suhu 50 °C, dari *Bacillus cereus* pada pH 7 dengan suhu 30°C dan

konsentrasi substrat 1,5%. Sedangkan dari *Bacillus* sp inulinase aktivitas optimum pada pH 8 dengan suhu 50 °C (Maria, 2005).

Penentuan aktivitas enzim inulinase dapat dihitung dari gula pereduksi yang dihasilkan persatuan waktu. Untuk mengetahui kadar gula pereduksi yang dihasilkan dari reaksi enzimatik inulinase digunakan asam dinitro salisilat. Asam dinitro salisilat (DNS) adalah suatu senyawa aromatis jika bereaksi dengan gula pereduksi akan membentuk asam 3-amino-5-nitrosalisilat (Miller, 1959). Metode analisis dengan reagen DNS terlihat lebih spesifik untuk mengetahui seberapa besar kadar gula pereduksi yang terdapat dalam sampel. Selain itu metode analisis kadar gula pereduksi menggunakan reagen DNS merupakan metode yang paling banyak digunakan untuk menentukan kadar gula pereduksi.

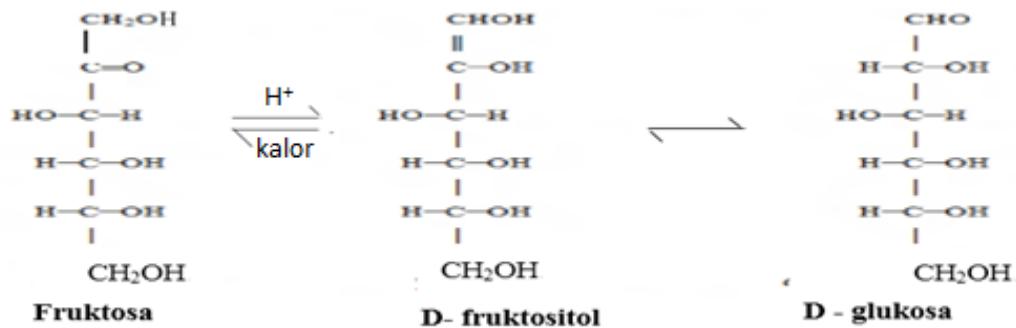


Gambar 5. Struktur DNS (Miloski *et al.*, 2008)

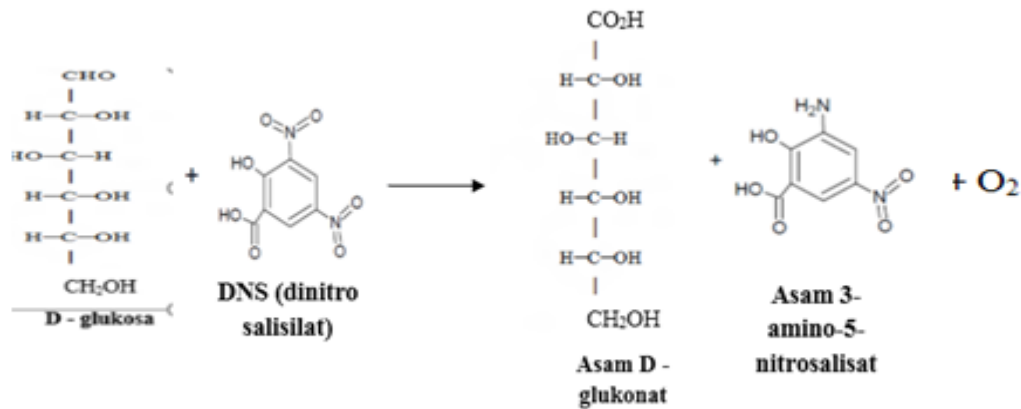
Gula pereduksi dapat bereaksi dengan reagen DNS. Reaksi gula pereduksi dengan reagen DNS merupakan reaksi redoks dimana gugus aldehyd yang bertindak sebagai pereduksi akan teroksidasi menjadi karboksil, sedangkan DNS yang bertindak sebagai oksidator akan tereduksi membentuk asam 3-amino dan 5-nitrosalisilat. Jika terdapat gula pereduksi pada sampel, maka larutan DNS yang awalnya berwarna kuning bereaksi dengan gula pereduksi dalam suhu tertentu menimbulkan warna jingga kemerahan. Reaksi berlangsung pada suasana basa dan

suhu yang tinggi 100°C (Kusmiati dan Agustini, 2010). Reduksi DNS oleh gula pereduksi berjalan cepat dan sempurna diperlukan pemanasan 100°C selama 15 menit, sehingga diperoleh pembentukan warna yang lebih intensif. Gambar 6 adalah reaksi fruktosa dengan reagen DNS (Miller, 1959).

Tahap I proses tautomerik



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



Gambar 6. Reaksi fruktosa dengan reagen DNS (Miloski, *et al.* 2008)

E. Pemurnian parsial enzim inulinase dengan Amonium sulfat

Enzim inulinase termasuk dalam tipe protein globular. Kelarutan protein bervariasi sesuai dengan kekuatan ion dari larutan, sehingga sesuai dengan

konsentrasi garam. Pada konsentrasi ion rendah ($<0,5$ M), kelarutan protein meningkat dengan meningkatnya konsentrasi garam, sebuah efek yang disebut "*salting-in*". Seiring konsentrasi garam semakin meningkat, kelarutan protein mulai menurun. Dengan kekuatan ion yang cukup tinggi, protein akan mengendap dari larutan, sebuah efek yang disebut "*salting-out*" (Dong-Ly *et al.*, 2014). Garam amonium sulfat sering digunakan untuk pengendapan karena kelarutannya yang tinggi (Burgess *et al.*, 2014).

Amonium sulfat adalah garam anorganik dengan kelarutan tinggi yang akan terionisasi menjadi ion amonium (NH_4^+) dan ion sulfat (SO_4^{2-}) dalam larutan berair. Amonium sulfat memiliki kerapatan yang rendah sehingga mampu menstabilkan struktur protein. Kelarutan protein globular akan meningkat dengan penambahan garam sehingga menyebabkan terjadinya *salting-in*. Pada konsentrasi garam yang lebih tinggi, kelarutan protein biasanya menurun, menyebabkan terjadinya *salting-out* (Green and Hughes, 1955). Garam akan mengurangi kelarutan protein sehingga meningkatkan kestabilan struktur asli protein sedangkan *salting-in* akan menyebabkan terjadinya denaturasi.

Konsentrasi penambahan amonium sulfat meningkat secara bertahap. Hal ini biasanya dilakukan dengan menambahkan ammonium sulfat padat. Namun, menghitung jumlah amonium sulfat yang harus ditambahkan untuk menambahkan larutan untuk mencapai konsentrasi yang diinginkan mungkin sulit karena penambahan amonium sulfat secara signifikan meningkatkan volume larutan. Jumlah amonium sulfat yang harus ditambahkan ke larutan dapat ditentukan dari tabel penambahan ammonium sulfat dapat dilihat pada Tabel 2. Setiap endapan protein

dapat dilarutkan secara terpisah dalam buffer standar dan diuji untuk menentukan kandungan protein total (Wingfield, 2001)

Tabel 2. Tabel penambahan Ammonium Sulfat

		Final concentration of ammonium sulphate															
		% saturation															
		10	20	25	30	33	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	90
Initial concentration of ammonium sulphate, (% saturation)		Grams solid ammonium sulphate to be added to 1 L of solution															
		0	56	114	144	176	196	209	243	277	313	351	390	430	472	516	561
10		57	86	118	137	150	183	216	251	288	326	365	406	449	494	592	694
20			29	59	78	91	123	155	189	225	262	300	340	382	424	520	619
25				30	49	61	93	125	158	193	230	267	307	348	390	485	583
30					19	30	62	94	127	162	198	235	273	314	356	449	546
33						12	43	74	107	142	177	214	252	292	333	426	522
35							31	63	94	129	164	200	238	278	319	411	506
40								31	63	97	132	168	205	245	285	375	469
45									32	65	99	134	171	210	250	339	431
50										33	66	101	137	176	214	302	392
55											33	67	103	141	179	264	353
60												34	69	105	143	227	314
65													34	70	107	190	275
70														35	72	153	237
75															36	115	198
80																77	157
90																	79

(Spadaro *et al.*, 2003)

F. Penentuan massa molekul inulinase dengan SDS-PAGE

Gel elektroforesis protein adalah teknik pemisahan molekul protein berdasarkan sifat fisiknya seperti muatan atau massanya dalam matriks gel menggunakan arus listrik. SDS-PAGE memisahkan protein terutama berdasarkan massanya karena detergent ionik *sodium dodecyl sulfate* (SDS) mendenaturasi dan

mengikat protein untuk membuat protein bermuatan negatif. Dengan demikian, ketika arus listrik dialirkan pada gel semua protein yang berikatan dengan SDS di dalam sampel akan bermigrasi melalui gel menuju anoda (elektroda muatan positif). Protein dengan massa rendah bergerak lebih cepat melalui gel dibandingkan protein dengan massa yang lebih besar karena 'sieving effect' dari matriks gel.

Pita protein yang telah dipisahkan dengan elektroforesis gel poliakrilamid, protein tersebut dapat ditransfer ke membran untuk analisis melalui *Western blotting* atau divisualisasikan langsung dalam gel menggunakan berbagai pewarnaan atau metoda deteksi. *Coomassie dye* adalah reagen yang paling populer untuk menstanning pita protein gel elektroforesis. Pada kondisi bufer asam, *Coomassie dye* berikatan dengan residu hidrofobik dari protein merubah pita protein menjadi biru. Seperti semua metode pewarnaan, *Coomassie dye* mendeteksi beberapa protein yang lebih baik daripada yang lain berdasarkan aksi kimia protein dan perbedaan komposisi protein. Pada kebanyakan protein, reagen *Coomassie dye* mendeteksi paling sedikit 10 nanogram per pita dalam sebuah gel mini (Azhar, 2016)

BAB V

PENUTUP

A. Simpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang penentuan massa molekul dan aktivitas enzim inulinase murni parsial dari bakteri *rizosfer* umbi *Dahlia* sp dapat disimpulkan :

1. Massa molekul inulinase dari isolate bakteri UKG ini sekitar ~43 KDa.
2. Aktivitas optimum inulinase sebesar 0.0748 U/mL pada pH 5,0 ; suhu 40°C dan konsentrasi substrat 2, 25% (w/v).

B. 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 massa molekul dari inulinase yang telah dimurnikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Allais, J.-J., Kammoun, S., Blanc, P., Girard, C., & Barrati, J. (1987). Isolation and Characterization of Bacterial Strains with Inulinase Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 942-945.
- Azhar, Minda. (2016). *Biomolekul sel : Karbohidrat, Protein, dan Enzim*. Padang : UNP Press
- Azhar, M., Natalia, D., Syukur, S., Vovien, & Jamsari. (2015). Gene Fragments that Encodes Inulin Hydrolysis Enzyme from Genomic *Bacillus licheniformis*: Isolation by PCR Technique Using New Primers. *International Journal of Biological Chemistry*, 9(2), 59-69.
- Azhar, Minda. (2009). Inulin sebagai prebiotik. *SAINTEK Vol. XII, Nomor 1*
- Barker, S.A. 1976. *Process Biochem.*, December, 20-25
- Basso, Alessandra. 2009. Endo-and Exo-Inulinase: Enzyme-Substrat Interaction and Relational Immobilization. *Crit Rev B iotechnol vol 3*.
- Bowen, G. D., and Rovira, A. D. (1999). *The Rhizosphere and Its Management to Improve Plant Growth*. Advances in Agronomi, Vol 66. Australia : Acadclnic Press
- Burgess, Richard R. (2009). Deutscher, Richard R. Burgess and Murray P., ed. *Methods in Enzymology. Guide to Protein Purification, 2nd Edition*. 463. Academic Press.
- Campbell, N.A, J.B Reece and L.G Mitchell. 2000. *Biologi Edisi Kelima Jilid 1 terjemahan*. Jakarta: Erlangga
- Castro C, *et al.* (1995) Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 177(20):5732-9
- Duong-Ly, Krisna C.; Gabelli, Sandra B. (2014). Lorsch, Jon, ed. *Methods in Enzymology. Laboratory Methods in Enzymology: Protein Part C*. 541. Academic Press. pp. 85–94
- Ertan, F., T. Aktac, A. C. Kaboglu, F. Ekinici & E. Bakar. 2005. *Determination of Optimum Cultivation Condition on The Production of Inulinase from Rhizoctonia solani*. *Pak.J. Bio.l Sci* 6 (16): 1386-1388.