

PENENTUAN AKTIVITAS INULINASE PADA SUBSTRAT INULIN A1-KG DARI BAKTERI MESOFILIK RIZOSFER UMBI DAHLIA (*DAHLIA SP*)

Awaluddini Ma'riffattullah¹, MindaAzhar^{*2}, Iryani^{*3}

Jurusan Kimia, Fak. Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Padang
Jln. Prof. Dr.Hamka Air Tawar Padang, Indonesia Telp. 0751 7057420

Abstract

Inulinase is an enzyme that can catalyze inulin hydrolysis reaction to fructose and fructooligosaccharide (FOS) which two important compounds in the food industry. This study aims to determine the optimum activity of inulinase on variations in pH (3.5; 4; 4.5; 5; and 5.5), temperature (18°C; 25°C; 28°C; 37°C and 45°C); and substrate concentration (0.5%; 1%, 1.5%, 2% and 2.25%) with an incubation time of 30 minutes. In addition, this study also aims to determine the value of K_M , V_{max} and determine the type of action of inulinase. Determination of the optimum activity of inulinase was determined by DNS reagents whose absorbance was measured using spice at λ 536 nm. Determination of the type of action of the inulinase enzyme is determined by the TLC method. Inulinase activity found optimum at pH 4; 40°C temperature and 2% substrate concentration. The values of K_M and V_{max} inulinase are 3.12% (w/v) and V_{max} is 0.288 U / mL. The type of action of inulinase enzymes found in Rhizosphere bacteria dahlia isolates A1-KG is endoinulinase.

Keywords: *inulin, inulinase, inulinase enzyme activity, and type of inulinase action from bacteria.*

Abstrak

Inulinase merupakan suatu enzim ekstraseluler yang berperan penting dalam hidrolisis inulin untuk menghasilkan fruktosa dan fruktooligoskarida yang berperan penting dalam industri pangan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan aktivitas optimal dari inulinase pada factor variasi pH (3.5, 4, 4.5, 5.0, 5.5), suhu (18, 25, 28, 37, 45)°C, dan konsentrasi substrat (0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0%, 2.5%). Waktu inkubasi yang digunakan adalah 30 menit. Selain itu, penelitian ini juga bertujuan untuk menentukan nilai K_M , V_{maks} dan menentukan tipe aksi inulinase. Penentuan aktivitas optimum inulinase ditentukan dengan pereaksi DNS yang absorbansinya diukur menggunakan spektrometri pada panjang gelombang 536 nm. Penentuan tipe aksi enzim inulinase ditentukan dengan metode KLT. Berdasarkan hasil penelitian, diperoleh aktivitas optimal inulinase berada pada pH 4, suhu 37°C, konsentrasi substrat 2,5%. Nilai K_M dan V_{maks} inulinase adalah 3,12 % (w/v) dan V_{maks} 0,288 U/mL. Tipe aksi enzim inulinase yang ditemukan pada bakteri rizosfer umbi dahlia isolat A1-KG yaitu endoinulinase.

Kata kunci-- *inulin, enzim inulinase, aktivitas inulinase, tipe aksi inulinase*

PENDAHULUAN

Pemanfaatan enzim dalam berbagai bidang industri sudah dimulai sejak pertengahan abad ke-20. Industri-industri yang telah memanfaatkan enzim adalah industri pangan, farmasi dan medis, sandang dan lain-lain. Salah satu enzim yang mulai dilirik adalah inulinase yang berperan dalam menghidrolisis inulin. Inulin merupakan polimer unit-unit fruktosa dengan gugus terminal glukosa. Unit-unit fruktosa dalam inulin dihubungkan oleh ikatan β -(2,1)-Dfruktosil-fruktosa (Robertfroid, 2005).

Inulin merupakan suatu rantai polisakarida yang terdiri dari beberapa monosakarida fruktosa berikatan pada β -2-1 fruktofuranosida yang dimulai dengan ikatan glukosa (Nakamura, 1995). Inulin sebagai substrat dalam pembuatan fruktosa memiliki banyak keunggulan dibandingkan dengan pati yaitu: rendemen fruktosa yang didapat lebih tinggi (sekitar 92-98%)(Zhen, 2011), sedangkan pati hanya 45%. Waktu biokonversi yang lebih singkat (antara 10-12 jam), dan hanya memerlukan satu tahapan enzimatik yaitu inulinase (Sari, 2005).

Sumber alami inulin yang telah banyak digunakan secara komersial adalah chicory (*Cichorium intybus* L., var. sativum). Namun, chicory tidak tumbuh di Indonesia. Salah satu bahan baku lokal yang dilaporkan memiliki potensi sebagai sumber inulin adalah Umbi Dahlia.

Inulinase merupakan enzim yang mampu menghidrolisis polimer inulin menjadi bentuk oligosakarida melalui aktivitas endoinulinase dan monomer fruktosa melalui aktivitas eksoinulinase (Wijanarka, 2002). Enzim inulinase dapat diperoleh dari bakteri termofilik pendegradasi inulin yang bersumber dari beberapa mata air panas di Solok dan dari rizosfer umbi dahlia. Enzim ini dapat digunakan untuk pembuatan fruktosa dan FOS (fructooligosacharides) (Azhar, 2014).

Aktivitas inulinase dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya pH, suhu, dan konsentrasi substrat. Setiap enzim memiliki pH dan suhu optimum untuk bekerja paling aktif. Umumnya aktivitas inulinase yang dihasilkan berhubungan erat dengan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan. Semakin banyak jumlah gula pereduksi yang dihasilkan, maka semakin tinggi aktivitas inulinase dan begitu juga sebaliknya. Penentuan aktivitas inulinase dapat dilakukan dengan pereaksi asam Dinitrosalisilat(DNS) (Miller, 1959).

Pada penelitian sebelumnya telah dilaporkan tentang aktivitas inulinase. Aktivitas optimum inulinase dari bakteri *Bacillus cereus* terjadi pada pH 7 dan suhu 30°C dan substrat 1.5% (Meenakshi, 2012). Kondisi optimum crude enzim inulinase dari jamur *Aspergillus diveus* pada pH 4.0 dan 4.8, suhu optimum 45°C (Maria, 2005). Menurut (suryono, 2008) melaporkan inulinase dari *Aspergillus niger* memiliki suhu optimum 45°C dan pH optimum 4.6. Beberapa bakteri lainnya yang berperan dalam mendegradasi inulin adalah *Bacillus sp*, *Candida sp*, *Marinimicrobium sp*, *Nocardiosis sp*, *Sphingobacterium sp*, *Clostridium sp* dan *Geobacillus sp* (Singh *et al.*, 2016).

METODE PENELITIAN

Material

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini antara lain: autoclav, inkubator, shaker inkubator, oven, mikrosentrifus PrismR, neraca analitik, spektrofotometer Genesys 20 Monocromator Init, pH meter, termometer, pipet mikro, tip, tabung mikro, peralatan gelas, jarum ose, lampu spritus, dan penangas air.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu: *crude* inulinase, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, Trisodium sitrat, inulin, Bakto Agar, Buffer Asetat, Buffer Fosfat, Asam Asetat p.a, Etanol 70%, aquades, CH_3COONa , NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , reagen DNS, reagen Anilin difenilamin, Lugol's iodine, Asam Asetat p.a 35 v/v, Kloroform p.a 30 v/v, fruktosa, sumbat kapas, plastik wrap, plastik kaca, dan aluminium foil.

Eksperimental

Ekstraksi crude enziminulinase

Single coloni bakteri mesofilik dimasukan ke dalam 2 mL medium cair pada erlenmeyer 50 mL dan dishaker selama 18-20 jam hingga terbentuk kultur bakteri. Kultur bakteri dipipet sebanyak 1,5 mL kemudian dipindahkan ke dalam 15 mL medium cair dan dishaker selama 20 jam. Kultur bakteri tersebut dipindahkan ke dalam tabung mikro untuk disentrifus pada 12.000 rpm, suhu 5°C selama 20 menit. Ekstrak bening yang telah terpisah dari endapan bakteri dipipet kedalam tabung mikro yang bersih dan steril. Ekstrak tersebut merupakan crude enzim yang akan ditentukan aktivitas dan tipe aksinya pada substrat inulin.

Pengujian Inulinase Ekstraseluler

Pengujian inulinase ekstraseluler dilakukan pada media padat yang telah ditumbuhi bakteri penghasil inulinase. Secara kualitatif, aktivitas enzim ekstraseluler dapat diketahui dengan menambahkan larutan Lugol's pada media padat tersebut (Xia Li, 2011). Hasil pengujian inulinase ekstraseluler berdasarkan analisa kualitatif.

Pengukuran Absorbansi Larutan Standar Fruktosa

Larutan Standar fruktosa dengan konsentrasi 100-900 µg/ mL yang telah diencerkan dari larutan induk fruktosa 1000 µg/ mL. Masing-masing dipipet sebanyak 75 µL ke dalam tabung mikro, kemudian ditambahkan 75 µL reagen DNS.

Dipanaskan larutan pada air mendidih selama ±10 menit, selanjutnya didinginkan pada suhu ruang kemudian ditambahkan aquades 850 µL sambil dihomogenkan. Serapan diukur pada λ 540 nm. Didapatkan Absorbansi larutan standar fruktosa. Untuk blanko dipakai aquades sebanyak 75 µL sebagai pengganti larutan standar fruktosa (dilakukan dengan cara yang sama sesuai prosedur di atas).

Penentuan Aktivitas Inulinase

Tabung mikro sebanyak 2 buah diisi campuran yang berbeda. Tabung pertama sebagai Enzim Sampel (AES) diisi dengan 50 µL larutan inulin 2.5 %, 50 µL buffer asetat atau buffer fosfat 0.2 M dengan pH 3.5 dan 50 µL crude enzim inulinase. Tabung kedua sebagai Enzim Kontrol (AEK) diisi dengan 50 µL larutan inulin 2.5%, 50 µL buffer asetat atau buffer fosfat 0.2 M dengan pH 3.5 dan 50 µL crude enzim yang dinonaktifkan sebagai kontrol. Kedua tabung diinkubasi pada suhu ruang selama ±30 menit. Kemudian dipanaskan pada air mendidih selama ±10 menit.

Kedua tabung didinginkan pada suhu ruang, setelah itu ditambahkan reagen DNS sebanyak 150 µL. Kemudian kedua tabung dipanaskan pada air mendidih selama ±10 menit. Didinginkan pada suhu ruang, setelah itu ditambahkan aquades sebanyak 700 µL. Larutan dihomogenkan dan diukur absorbansi pada λ 540 nm. Satu tabung untuk blanko, diisi aquades sebagai pengganti sampel dengan perlakuan yang sama (catatan: blanko tidak ada enzim dan substrat). Hal yang sama dilakukan pada variasi pH, suhu dan konsentrasi substrat yang telah ditetapkan.

Penentuan Tipe Aksi Inulinase

Penentuan tipe aksi ekso-inulase atau endo-inulinase dilakukan pada produk hidrolisis inulin akibat aktivitas enzim ekstraseluler pada substrat inulin menggunakan KLT. Produk hidrolisis inulin dengan waktu inkubasi 12, 24 dan 36 jam ditotolkan sebanyak 3 µL pada plat KLT silica gel 60 F254 dengan ukuran 10 × 10 cm, dibuat batas bawah 1.5 cm dan batas atas 0.5 cm. Kemudian ujung plat KLT dimasukkan pada *chamber* yang telah berisi campuran asam asetat, kloroform, dan air (35: 30: 5, v/v/v). Campuran tersebut berfungsi sebagai fasa gerak.

Marker yang digunakan adalah larutan standar fruktosa 1% sebagai pembanding terhadap sampel yang akan ditentukan tipe aksinya menggunakan KLT. Sampel dibiarkan terelusi sampai batas atas selama ±30 menit dan dikeringkan dengan *hair dryer*. Produk

hidrolisis inulin pada plat KLT disemprot dengan reagen anilin-difenilamin dan dimasukkan pada oven dengan suhu 100°C selama ± 15 menit hingga terjadi pemisahan komponen (Ertan dan Ekinci, 2002). Berdasarkan pemisahan komponen pada hasil hidrolisis inulin tersebut dapat dilihat perpindahan noda. Jika perpindahan noda yang ditotolkan tidak sejajar dengan noda larutan standar fruktosa 1%, maka hasil hidrolisis inulin tersebut tidak mengandung fruktosa. Tipe aksi inulinase ditentukan berdasarkan produk yang dihasilkan dari hidrolisis inulin. Inulinase yang akan ditentukan tipe aksinya adalah produk hidrolisis inulin pada aktivitas optimum.

Teknik analisis data

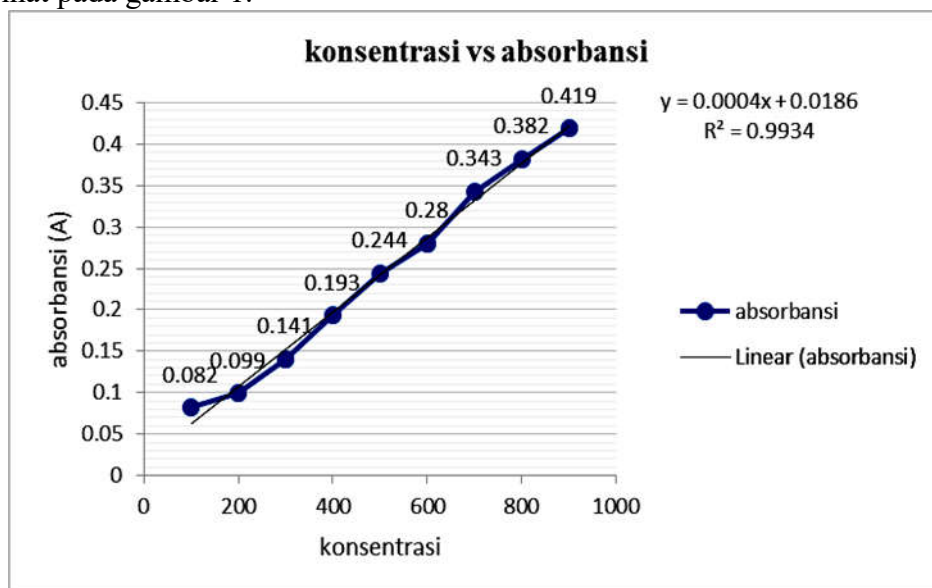
Analisis data pada penelitian ini terdiri dari dua analisis yaitu analisis kuantitatif dan analisis kualitatif. Analisis kuantitatif berdasarkan data absorbansi larutan standar fruktosa dan data aktivitas inulinase pada variasi pH, suhu dan konsentrasi substrat.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil

Pembuatan Kurva Larutan Standar Fruktosa

Absorbansi larutan standar Fruktosa diukur pada deret konsentrasi 100–900 $\mu\text{g/mL}$ dengan menggunakan spektrofotometer Genesys 20. Pengukuran dilakukan pada panjang gelombang 536 nm dengan menggunakan reagen DNS (dinitrosalisilat). Berdasarkan data absorbansi larutan standar fruktosa maka diperoleh grafik hubungan antara konsentrasi larutan dengan absorbansi larutan. Grafik hubungan antara konsentrasi dengan absorbansi dapat dilihat pada gambar 1.

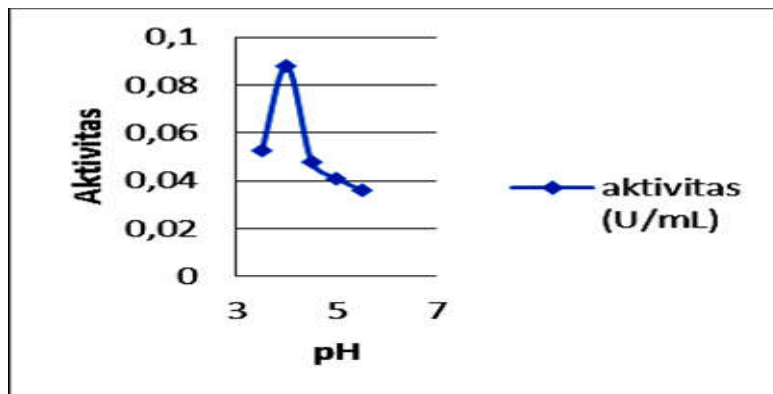


Gambar 1. Kurva Persamaan Regresi Linear dari Absorbansi Larutan Standar Fruktosa

Penentuan aktivitas enzim inulinase pada variasi pH

Absorbansi dari variasi pH diukur pada panjang gelombang 536 nm, dengan selisih absorbansi sampel dan kontrol terbesar adalah 0,2085A pada pH 4.

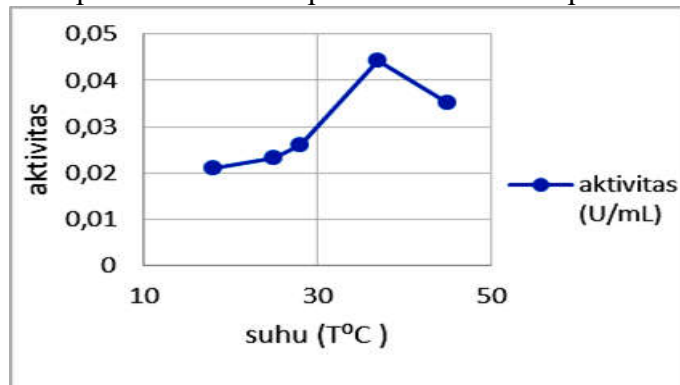
Perbandingan aktivitas inulinase pada variasi pH dapat dilihat pada gambar 3.



Gambar 3. Aktivitas optimum inulinase pada variasi pH

Penentuan aktivitas enzim inulinase pada variasi suhu

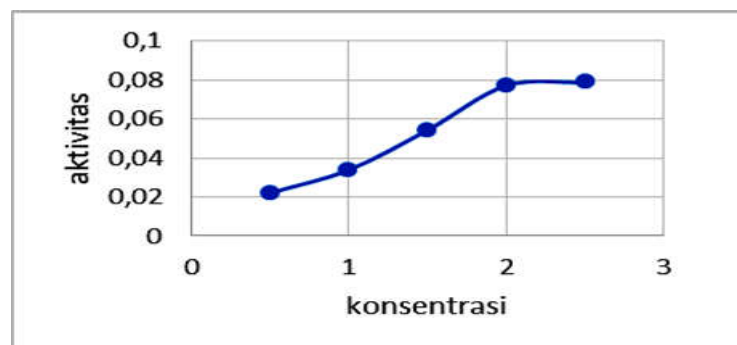
Penelitian dilakukan pada variasi suhu 18°C; 25°C; 28°C; 37°C dan 45°C didapat selisih absorbansi sampel dan kontrol terbesar pada suhu 37°C yaitu 0,1165 A. Aktivitas optimum inulinase yang didapat pada suhu optimum adalah $4,437 \cdot 10^{-2}$ U/mL. Perbandingan aktivitas optimum inulinase pada variasi suhu dapat dilihat pada gambar 5.



Gambar 5. Aktivitas optimum inulinase pada variasi suhu

Penentuan aktivitas enzim inulinase pada variasi konsentrasi substrat

Pada penelitian ini, variasi konsentrasi yang digunakan adalah 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; 2,5%. Pengaruh konsentrasi substrat terhadap aktivitas enzim inulinase dapat dilihat pada gambar 7.

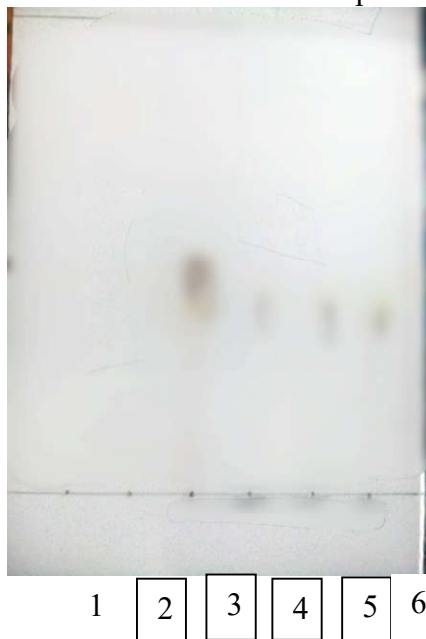


Gambar 7. Grafik aktivitas inulinase pada variasi konsentrasi substrat

Tipe Aksi Enzim inulinase

Tipe aksi enzim inulinase ditentukan melalui metode *Thin Layer Chromatography* (TLC). Pada penelitian ini, larutan glukosa 1% dan larutan standar fruktosa 1% (w/v)

digunakan sebagai standar gula pereduksi. Kedua larutan standar ini dapat dijadikan sebagai acuan gula pereduksi yang dihasilkan dari hidrolisis inulin akibat aktivitas enzim ekstraseluler. Produk hidrolisis inulin pada kondisi optimum dielusi secara serentak bersama standar yang digunakan dan memberikan hasil seperti Gambar 8.



Gambar 8. Kromatogram TLC produk hidrolisis inulin dari crude inulinase. 1; enzim inulinase non-aktif, 2; glukosa 1 % (sebagai standar), 3; fruktosa 1 % (sebagai standar) glukosa 1 % (sebagai standar), 4;hidrolisis 42 jam, 5; hidrolisis 24jam, 6; hidrolisis 18 jam.

PEMBAHASAN

Pembuatan Kurva Standar Fruktosa

Hasil data absorbansi variasi konsentrasi larutan standar fruktosa didapatkan persamaan regresi linear. Pada grafik (Gambar 10) diperoleh kurva persamaan regresi linear untuk larutan standar fruktosa adalah $y=0.0004x + 0.0186$ dengan besar regresi $R^2=0.9934$. persamaan ini berfungsi untuk menentukan kadar fruktosa atau gula pereduksi sampel yang merupakan produk hidrolisis inulin menggunakan inulinase.

Aktivitas Enzim Ekstraseluler

Aktivitas enzim dinyatakan sebagai banyaknya fruktosa (μmol) yang dibebaskan setiap mL *crude* enzim tiap menit (U/mL) (Sari, 2005). Aktivitas enzim menunjukkan tingkat kemurnian suatu enzim (Lehninger, 2007). Aktivitas suatu enzim dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu pH, suhu, konsentrasi substrat dan lama inkubasi. Kondisi optimum dari faktor-faktor tersebut akan mempengaruhi aktivitas optimum inulinase, jika faktor berada dibawah atau diatas kondisi optimum maka enzim tidak bekerja secara optimal.

a. pengaruh variasi pH terhadap aktivitas inulinase

Aktivitas enzim dipengaruhi oleh pH saat enzim bereaksi dengan substrat. Enzim ekstraseluler umumnya memiliki aktivitas optimum pada pH asam (saryono, 2008). Penentuan aktivitas inulinase terhadap variasi pH dilakukan pada suhu ruang ($28\text{ }^\circ\text{C}$) dengan konsentrasi substrat yang digunakan adalah 2,5% (w/v) dan diinkubasi selama 30 menit. Pada Gambar 12, dapat dilihat bahwa aktivitas optimum enzim terjadi pada pH 4 sebesar $8,786 \cdot 10^{-2}$ U/mL dan menurun setelah melewati pH optimum.

Perubahan pH akan merubah konformasi enzim, gugus dalam posisi aktif maupun pengikatan enzim substrat. Hal ini disebabkan enzim mempunyai gugus yang mudah mengion yang disebut dengan gugus prototropik yang berada pada rantai samping asam amino.

Kondisi pH yang terlalu jauh dari pH optimum akan menyebabkan enzim terdenaturasi karena semakin banyaknya gugus prototropik yang bermuatan sejenis menyebabkan gaya tolak molekul protein besar dan terbukanya lipatan molekul protein sehingga katalitiknya hilang.

Hal ini disebabkan karena perubahan nilai pH seiring dengan perubahan muatan residu asam amino pada enzim. Saat pH meningkat maka jumlah $[H^+]$ akan berkurang di dalam larutan, sehingga gugus aktif kehilangan muatan positif. Akibatnya ikatan antara enzim dan substrat menjadi tidak tepat (Aruna *et al*, 2014).

b. pengaruh variasi suhu terhadap aktivitas inulinase

Aktivitas inulinase juga dipengaruhi oleh keadaan suhu lingkungan, biasanya range suhu yang umum digunakan pada penelitian adalah 25-55°C (Sari, 2005) dan optimum pada suhu antara 30-45°C (Galindo, 2016). Berdasarkan Ekofisiologi, enzim yang dihasilkan dari sumber yang berbeda memiliki suhu optimum yang berbeda. Penelitian ini menggunakan bakteri yang bersumber dari *rizosfer* umbi dahlia dan merupakan bakteri *mesofil*. Bakteri mesofil ialah bakteri yang dapat tumbuh optimal pada suhu 37 °C.

Berdasarkan gambar 14 dapat dilihat bahwa aktivitas inulinase maksimal pada suhu 37 °C sebesar $4,437 \cdot 10^{-2}$ U/mL . Aktivitas mulai menurun setelah melewati suhu 37 °C, hal ini menunjukkan bahwa enzim yang merupakan suatu protein akan terdenaturasi jika telah melewati suhu optimumnya. Suhu dapat mempercepat reaksi katalitik karena terjadi peningkatan energi kinetik sehingga memperbesar peluang pengikatan enzim dengan substrat. Namun, pada kondisi suhu yang terlalu tinggi reaksi katalisis enzim akan menurun.

Menurut Suhartono (1989) menyatakan pada suhu tinggi, akan terjadi perubahan konformasi enzim sehingga sisi aktif enzim mengalami hambatan dalam berikatan dengan substrat. Suhu yang terlalu rendah juga dapat menurunkan aktivitas enzim sebab energi aktivasi enzim belum tercapai sehingga peluang enzim berikatan dengan substrat terlalu kecil.

Selain itu, hal ini juga membuktikan bahwa bakteri yang bersumber dari *rizosfer* umbi dahlia merupakan bakteri *mesofil* yang tumbuh optimal pada suhu 37 °C.

c. pengaruh variasi konsentrasi substrat terhadap aktivitas inulinase

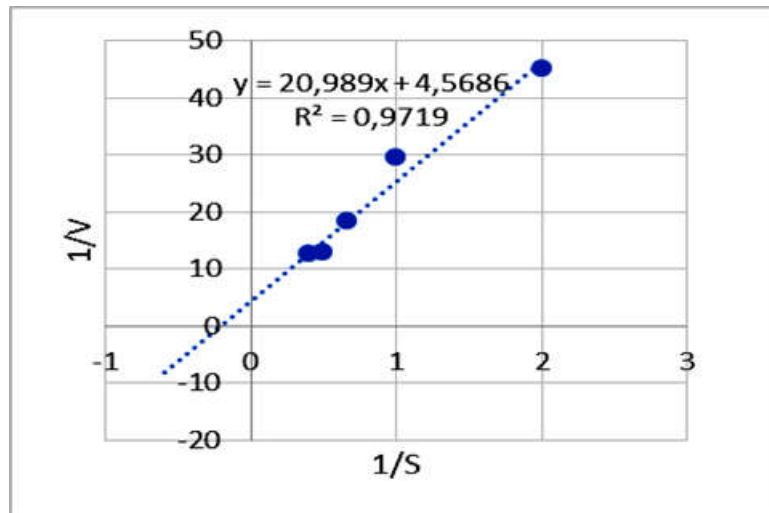
Konsentrasi substrat yang digunakan juga memengaruhi aktivitas inulinase. Penelitian ini menggunakan variasi konsentrasi substrat yaitu 0,5%; 1%; 1,5%; 2%; dan 2,5% (w/v). Aktivitas inulinase cenderung mengalami peningkatan hingga konsentrasi substrat 2,5% dengan aktivitas optimum sebesar $7,897 \cdot 10^{-2}$ U/mL .

Kondisi ini disebabkan adanya sumber karbon pada substrat yang berperan dalam pertumbuhan enzim. Enzim akan bekerja secara optimal hingga konsentrasi optimum. Namun akan konstan jika konsentrasi substrat terus ditambah dalam kondisi enzim yang tetap. Penambahan substrat pada enzim menyebabkan lebih banyak substrat yang berikatan dengan sisi aktif enzim dan akan meningkatkan aktivitas enzim.

Dalam kinetika enzim, kecepatan maksimum katalisis enzim ditentukan melalui perbandingan antara konsentrasi substrat dengan harga K_M dan V_{maks} . K_M atau tetapan Michaelis-Menten dapat didefinisikan sebagai konsentrasi substrat tertentu pada saat enzim mencapai setengah kecepatan maksimumnya (Lehninger, 1982).

Jika jumlah substrat lebih rendah dari harga K_M , maka laju reaksi berbanding lurus dengan substrat. Namun, jika substrat lebih besar daripada K_M maka laju reaksi maksimum dan tidak tergantung pada substrat. Pada saat harga K_M sama dengan substrat, maka laju reaksi sama dengan separuh laju maksimum reaksi, $V = \frac{V_{maks}}{2}$.

Laju maksimum dan nilai K_M ditentukan melalui persamaan Michaelis-Menten untuk diplotkan kedalam suatu grafik sehingga membentuk garis linear sesuai persamaan Lineweaver-Burk. Penempatan plot semacam ini disebut double-reciprocal plot. Kurva Lineweaver-Burk yang menggambarkan harga K_M dan V_{maks} enzim ekstraseluler dapat dilihat pada gambar 9.



Gambar 9. Kurva Lineweaver-Burk yang menggambarkan harga K_M dan V_{maks}

Pada Gambar 18, didapatkan harga K_M 4,59% (w/v) dan V_{maks} 0,2189 U/mL. Harga K_M yang didapatkan lebih besar dari konsentrasi substrat pada aktivitas optimum yaitu 2,5% (w/v). Jadi dapat dikatakan bahwa laju reaksi berbanding lurus dengan substrat.

Pada kondisi konsentrasi substrat yang terlalu tinggi enzim mengalami kejenuhan. Suatu cara untuk meningkatkan produktivitas enzim yaitu dengan menambahkan lebih banyak enzim (Campbell, 2000).

Tipe Aksi Inulinase

Inulinase adalah enzim yang mampu menghidrolisis inulin menjadi bentuk oligosakarida melalui aktivitas endo-inulinase, tetapi menjadi menjadi monomer fruktosa melalui aktivitas ekso-inulinase yang memotong ikatan β -2,1 secara berurutan (Mangunwidjaja, 2014). Tipe aksi inulinase ditentukan dengan kromatografi lapis tipis atau Thin Layer Chromatography.

Prinsip kerja dari TLC adalah pemisahan suatu komponen atau campuran berdasarkan kepolaran fasa diam dan fasa geraknya (Skowronek, 2005). TLC memanfaatkan perbedaan kepolaran antara fasa gerak (eluen) dengan fasa diam.

Pada penelitian ini, fasa diam yang digunakan adalah silica gel yang bersifat non-polar dan eluen yang digunakan adalah air, butanol dan asam asetat yang masing-masing bersifat polar, nonpolar dan asam lemah. Perbedaan kepolaran antara komponen dengan fasa diam menyebabkan komponen akan mengikuti aliran eluen yang lebih polar. Namun, akan tertahan pada fase diam jika kepolaran komponen rendah.

Tipe aksi inulinase dapat diketahui dengan membandingkan waktu retensi antara gula pereduksi produk hidrolisis inulin dan larutan standar gula pereduksi yang disediakan.

Pada Gambar 8, dapat dilihat bahwa noda dari glukosa 1% tidak ikut terelusi, sedangkan noda standar fruktosa 1% terelusi mengikuti aliran eluen. Larutan standar fruktosa tidak sejajar dengan produk hidrolisis inulin pada titik noda nomor 3,4 dan 5. Hal ini menandakan bahwa pada waktu inkubasi 18, 24 dan 42 jam didapat produk dari hidrolisis inulin berupa fruktosa. Tipe aksi enzim ekstraseluler yang diperoleh pada produk hidrolisis inulin adalah eksoinulinase.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah diperoleh dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Aktivitas inulinase optimum pada pH 4; suhu 37°C dan konsentrasi substrat 2,5% (w/v).
2. Nilai K_M dan V_{maks} inulinase dari isolat A₂-KG adalah 4,59% (w/v) dan 0,2189 U/mL.
3. Inulinase yang ditemukan adalah inulinase yang bertipe ekso-inulinase.

DAFTAR PUSTAKA

- Aruna, K and Amita Hati. 2014. *Optimization of Inulinase Production by Bacillus sp. B51f Isolated from Rhizosphere Soil of Agave sisalana*. Int. J. Pure App. Biosci. 2 (3): 161-176
- Azhar, M. (2014). Eksplorasi Bakteri Pendegradasi Inulin Yang Potensial untuk Pembuatan Fruktosa dari Sumber Air Panas Di Solok Dan Rizosfer Umbi Dahlia.
- Campbell, N.A, J.B Reece and L.G Mitchell. 2000. *Biologi Edisi Kelima Jilid 1 terjemahan*. Jakarta: Erlangga
- Lehninger, A. L. (2000). *Principles of Biochemist*. Jakarta: Erlangga.
- Maria, C. M. Auxiliadora, A. Lucia, K. Aparecida and J. Luiz. 2005. *Aspergillus niveus Blochwitz 4128URM: New Source for Inulinase Production*. Vol 48, pp343-350.
- Meenakshi, S., S. Umayaparvathi, P. Manivasagan, M. Arumugam and T. Balasubramanian. 2012. *Purification and Characterization of Inulinase from marine bacterium, Bacillus cereus MU-31*. Vol 42 (4), pp 510-515.
- Miller GL. 1959. *Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar*. Anal. Chem. 31: 426-428.
- Nakamura. (1995). Continuous Production of Fructose Syrup from Inulin by Immobilized Inulinase from *Aspergillus niger*. *Ferm.Bioeng*.
- Sari, S. L. (2005). Aktivitas Inulinase Jamur yang Diisolasi dari Tanah Sekitar Umbi Dahlia. *Bio SMART*, 1-5.
- Singh, R.S, Kanika Chauhan, and John F.Kennedy. 2016. *A Panorama of Bacterial Inulinases: Production, Purification, Characterization and Industrial Applications*. International Journal Biological Macromolecules.
- Saryono, P., Sulistyati., Deliza, Z. dan Atria , M. 1998. *Identifikasi Jamur Pendegradasi Inulin pada Rizosfer Umbi Dahlia (Dahlia variabilis)*. Jurnal natur Indonesia. II (1): 22-27.
- Skowronek, M., dan Fiedurek, J. 2006. "Purification and Properties of Extracellular Endoinulinase from *Aspergillus niger* 20 OSM". *Food Technol Biotechnol*. 44(1): 53-58.
- Wijanarka. (2013). Kinetika Pertumbuhan Dan Produksi Inulinase Fusan F7. *Lab. Mikrobiologi_FSM Undip*.