

**ISOLASI DAN OPTIMALISASI BAKTERI TERMOFILIK
PENGHASIL INULINASE DARI SUMBER AIR PANAS LEJJA
KABUPATEN SOPPENG, SULAWESI SELATAN**

AHMAD MALDINI

H031 17 1023



**DEPARTEMEN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2023**

**ISOLASI DAN OPTIMALISASI BAKTERI TERMOFILIK
PENGHASIL INULINASE DARI SUMBER AIR PANAS LEJJA
KABUPATEN SOPPENG, SULAWESI SELATAN**

*Skripsi ini diajukan sebagai salah satu syarat
untuk memperoleh gelar sarjana sains*

Oleh

AHMAD MALDINI

H031171023



MAKASSAR

2023

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**ISOLASI DAN OPTIMALISASI BAKTERI TERMOFILIK
PENGHASIL INULINASE DARI SUMBER AIR PANAS LEJJA
KABUPATEN SOPPENG, SULAWESI SELATAN**

Disusun dan diajukan oleh

AHMAD MALDINI


H031 17 1023

Telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Sidang Sarjana Program Studi
Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Pada 14 Juni 2023
dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

Menyetujui,

Pembimbing Utama

Pembimbing Pertama


Dr. Rugaiah A. Arfah, M.Si
NIP.19611231 198702 2 002


Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si
NIP. 19811209200604 2003

Ketua Program Studi



Dr. St. Fauziah, M. Si
NIP. 19720202 199903 200

PERNYATAAN KEASLIAN

Yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Ahmad Maldini
NIM : H031171023
Program Studi : Kimia
Jenjang : S1

Menyatakan dengan ini bahwa Skripsi dengan judul "Isolasi dan Optimalisasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan" adalah karya saya sendiri dan tidak melanggar hak cipta pihak lain. Apabila dikemudian hari terbukti bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah hasil karya orang lain yang saya pergunakan dengan cara melanggar hak cipta pihak lain, maka saya bersedia menerima sanksi.

Makassar, 14 Juni 2023

Yang Menyatakan,



Ahmad Maldini

PRAKATA

Bismillahirrohmanirrohim, *بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ* Puji syukur tak henti-hentinya penulis panjatkan kehadiran Allah SWT, atas karunia Nikmat dan Berkah yang senantiasa tercurah sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul **“Isolasi dan Optimalisasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase Dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan”**

Sholawat dan salam juga tak pernah lupa selalu tercurah kepada baginda Rasulullah Muhammad Saw. (*Allohumma sholli 'ala sayyidina Muhammad*), sosok yang selalu jadi panutan setiap orang dengan perbuatan dan perkataannya, semoga kita semua senantiasa dapat mencontoh perilaku beliau.

Ucapan terima kasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada seluruh pihak yang membantu dalam proses penyelesaian skripsi ini, terutama kepada ibunda **Dr. Rugaiyah A. Arfah, M.Si** selaku pembimbing utama dan ibunda **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si** selaku pembimbing pertama yang telah menjadi orang tua penulis dikampus serta senantiasa meluangkan waktu dan tenaga dalam membimbing dan memberikan masukan kepada penulis, begitupun semangat pantang menyerah agar penulis dapat menyelesaikan skripsi ini. Tak lupa pula penulis menghaturkan permohonan maaf yang sebesar-besarnya atas semua kesalahan baik yang disengaja maupun tidak disengaja yang pernah dilakukan penulis hingga penulisan skripsi ini diselesaikan.

Penulis juga tak lupa mengucapkan terima kasih dan penghargaan yang sebesar-besarnya kepada:

1. Ayahanda **Dr. Eng Amiruddin**, selaku Dekan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Hasanuddin beserta semua staf pegawai.

2. Ibunda **Dr. St. Fauziah, M.Si.** selaku ketua Departemen Kimia, Ibu **Dr. Nur Umriani Permatasari, M.Si.** selaku Sekertaris Departemen dan semua dosen-dosen kimia serta staf pegawai yang telah membantu proses perkuliahan selama ini.
3. Ayahanda **Dr. Syarifuddin Liong, M.Si.** dan **Drs. Fredryk Welliam Mandey, M.Sc.** selaku Tim Penguji Ujian Sarjana Kimia yang telah meluangkan waktu serta memberi masukan dan saran.
4. Seluruh staf pegawai lingkup fakultas dan analis Laboratorium di Departemen Kimia, terkhusus untuk Ibu **Mahdalia, S.Si. M.Si.** kak **Andi Akbar, S.Si.** dan **Wahyuddin Rauf, S.Si.** selaku analis laboratorium Biokimia atas bantuan semangat serta arahnya selama penelitian berlangsung.
5. Semua rekan kerja peneliti di lab biokimia dan semua teman-teman seperjuangan di Departemen Kimia, terkhusus **Kimia 2017**, terima kasih atas arahan dan masukan-masukannya selama kuliah.
6. My support system **Fitri, S.P** terima kasih telah menemani dan selalu membantu dalam penyelesaian skripsi ini, serta telah membagi tawa bahagia kepada penulis dalam setiap kondisi apapun.

Kepada kedua orang tua tercinta ibunda, ibunda, ibunda **Rosmini** dengan segala doa-doanya setiap hari untuk penulis, dengan harapan penulis akan menjadi pribadi yang lebih baik, begitupun Ayahanda **Mustamin** yang selalu memberikan contoh yang baik kepada penulis, rasa tanggung jawab, semangat serta karakter yang kuat, begitupun kasih sayang dari keduanya yang menjadi landasan kuat dalam menyelesaikan tugas akhir penulis. Terima kasih juga kepada saudara dan saudari kandung penulis **Rudi Akbar dan Mustika** yang selalu memberikan motivasi dan semangat. Ucapan terima kasih serta doa juga penulis ucapkan kepada

Almarhum **H. Kamaruddin**, yang juga selalu menyemangati penulis dalam menyelesaikan tugas akhir, almarhum selalu berharap bisa menyaksikan penulis menyelesaikan pendidikannya, tapi tuhan berkehendak lain, semoga Almarhum mendapat tempat terbaik di sisi Allah SWT.

Penulis menyadari masih banyak kesalahan dan kekurangan dalam penyusunan skripsi ini, oleh karena itu saran dan kritik yang bersifat membangun sangat penulis harapkan. Semoga tulisan ini dapat memberikan manfaat bagi penulis dan semua orang yang membaca tulisan ini. Aamiin.

Penulis,

2023

ABSTRAK

Inulinase merupakan enzim yang dapat menghidrolisis inulin menjadi fruktosa atau fruktooligosakarida. Inulinase dapat dihasilkan oleh beberapa tumbuhan dan mikroorganisme. Enzim-enzim yang berasal dari mikroorganisme terutama dari bakteri termofilik memiliki nilai komersil yang tinggi serta peran penting dalam bidang industri. Penelitian ini bertujuan untuk melakukan isolasi dan optimalisasi bakteri penghasil inulinase. Inulinase diisolasi dari bakteri termofilik yang berasal dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan. Tahap pertama adalah dilakukan skrining dan identifikasi DNA bakteri penghasil inulinase. Tahap kedua adalah mengoptimalkan bakteri penghasil inulinase yang dilakukan dengan melakukan desain eksperimen *Response surface method* (RSM) menggunakan variabel konsentrasi substrat, waktu inkubasi dan pH. Hasil penelitian menunjukkan isolat terpilih T.1.2_A penghasil inulinase merupakan bakteri jenis *Bacillus cereus*.

Kata kunci : *Bacillus cereus*, bakteri termofilik, Inulinase, *Response surface method* (RSM) dan 16S rRNA.

ABSTRACT

Inulinase is enzyme can hydrolyze inulin into fructose or fructooligosaccharides. Inulinase can be produced by some plants and microorganisms. Enzyme derived from microorganisms, especially from thermophilic bacteria, have a high commercial value and an important role in the industrial field. This study aims to isolation and optimize inulinase-producing bacteria. Inulinase isolated from thermophilic bacteria originating Lejja hot springs, Soppeng Regency, South Sulawesi. The first step is to screen and identify the DNA of bacteria inulinase-producing. The second stage is to optimize inulinase-producing bacteria by conducting an experimental design *Response surface method* (RSM) using variables of substrate concentration, incubation time and pH. The results showed that the inulinase-producing T.1.2_A isolates were *Bacillus cereus* bacteria with 99% similarity.

Keywords : *Bacillus cereus*, Inulinase, *response surface method* (RSM), thermophilic bacteria and 16S rRNA

DAFTAR ISI

	halaman
PRAKATA	v
ABSTRAK	viii
ABSTRACT	ix
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN	xv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian	5
1.3.1 Maksud Penelitian	5
1.3.2 Tujuan Penelitian	5
1.4 Manfaat Penelitian	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	7
2.1 Bakteri	7
2.2 Bakteri Termofilik	8
2.3 Enzim Termostabil	9
2.4 Enzim Inulinase	11
2.5 Inulin	13
2.6 Metode RSM (<i>Response Surface Methodology</i>)	16
BAB III METODE PENELITIAN	18
3.1 Bahan Penelitian	18
3.2 Alat Penelitian	18
3.3 Waktu dan Tempat Penelitian	18
3.4 Prosedur Penelitian	19
3.4.1 Pengambilan Sampel	19
3.4.2 Pembuatan Reagen	19

3.4.2.1 Pembuatan Reagen DNS	19
3.4.2.2 Pembuatan Reagen Lowry.....	19
3.4.3 Pembuatan Medium.....	20
3.4.3.1 Pembuatan Medium Luria Bertani (LB) Cair.....	20
3.4.3.2 Pembuatan Medium Luria Bertani (LB) Padat.....	20
3.4.3.3 Pembuatan Medium Selektif Inulinase	20
3.4.4 Skrining dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase.....	21
3.4.4.1 Skirining Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase dari Sumber Air Panas Lejja.....	21
3.4.4.2 Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase dari Sumber Air Panas Lejja.....	23
3.4.5 Optimasi Produksi Inulinase	24
3.4.6 Uji Aktivitas Inulinase	25
3.4.7 Penentuan Kadar Protein.....	26
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1 Isolasi dan Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase	28
4.1.1 Skirining Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase dari Sumber Air Panas Lejja.....	28
4.1.2 Identifikasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase dari Sumber Air Panas Lejja.....	30
4.2 Optimalisasi Produksi Inulinase dari Bakteri Termofilik Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan	34
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
5.1 Kesimpulan.....	41
5.2 Saran.....	41
DAFTAR PUSTAKA	42
LAMPIRAN	47

DAFTAR GAMBAR

Gambar	halaman
1. Hidrolisis inulin oleh exo-inulinase	12
2. Struktur inulin	15
3. Bakteri penghasil inulinase	29
4. Serbuk hasil ekstraksi inulin	31
5. Pohon filogenetik bakteri penghasil inulinase	33
6. Plot kontur interaksi konsentrasi substrat, waktu inkubasi dan pH .	37
7. Penentuan titik optimum produksi	38
8. Identifikasi karakteristik gugus fungsi dengan FTIR.....	40

DAFTAR TABEL

Tabel	halaman
1. Faktorial Metode Optimasi Respon Permukaan	25
2. <i>Analysis of variant ANOVA</i>	35

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	halaman
1. Bagan alir penelitian	47
2. Bagan kerja penelitian.....	48
3. Lokasi pengambilan sampel.....	50
4. Karakteristik struktur inulin dengan FTIR.....	51
5. Urutan nukleotida dan kromatogram gen 16S rRNA.....	52
6. Reaksi gula reduksi dengan DNS	53
7. Tabel dan perhitungan.....	54
8. Foto percobaan.....	62

DAFTAR ARTI SIMBOL DAN SINGKATAN

Simbol/Singkatan	Arti
LB	Luria Bertani
FOS	Fruktooligosakarida
RSM	<i>Response Surface Methodology</i>
DNS	<i>Dinitrosalicylic Acid</i>
BSA	Bovine Serum Albumin
FTIR	<i>Spektrofotometer Fourier Transform Infra Red</i>
μL	mikroliter
Unit	Satuan aktifitas
U/mg	Unit per milligram
U/mL	Unit per milliliter
nm	nanometer
pH	Tingkat keasaman
T.1.2 _A	Isolat bakteri penghasil inulinase dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki kepulauan dengan aneka sumber daya alam yang mendukung keanekaragaman mikroorganisme yang berasal dari sumber air panas (Firliani dkk., 2015). Sumber air panas umumnya mengandung mikroorganisme yang dapat berkembang dengan baik pada temperatur tinggi yang dikenal dengan mikroorganisme termofilik. Mikroorganisme termofilik adalah mikroorganisme yang mampu hidup pada suhu 45-85 °C. Dalam banyak kasus mikroorganisme termofilik tidak hanya mampu beradaptasi terhadap kondisi ekstrim tetapi juga membutuhkan kondisi ini untuk memproduksi enzim yang bersifat termostabil (Mahmudah dkk., 2016).

Indonesia bagian timur memiliki sumber daya alam yang unik dan ekstrim. Daerah di Indonesia bagian timur dengan kondisi ekstrim salah satunya adalah Kabupaten Soppeng yang menghasilkan panas bumi berupa mata air panas Lejja yang ditemukan di kawasan hutan lindung berbukit Desa Bulu, Kecamatan Marioriawa, 44 km utara Kota Watangsoppeng yang merupakan ibu kota Kabupaten Soppeng. Menurut Arfah dkk. (2014) bahwa sumber air panas Lejja memiliki suhu 45-65 °C, dan pH 7,0. Menurut Mahmudah dkk. (2016) mata air panas Lejja bertipe bikarbonat yang kaya akan mineral dan suhunya mencapai 60 °C dengan kandungan sulfur mencapai 1,5%. Pada lingkungan ini memungkinkan adanya mikroorganisme yang memiliki potensi menghasilkan enzim termostabil.

Dalam berbagai perkembangan industri saat ini, enzim sudah banyak dimanfaatkan pada berbagai bidang seperti kesehatan, farmasi, kimia, bahan

makanan dan material nanosensor. Salah satu enzim tersebut adalah inulinase, yaitu katalis yang mampu memecah polisakarida inulin menjadi unit-unit yang lebih kecil yaitu fruktosa. Fruktosa dapat diproduksi melalui hidrolisis enzimatis pati, namun metode ini cukup mahal dan hanya diperoleh hasil hingga 45%. Inulin adalah polisakarida dari unit fruktosa yang berikatan β -2,1-glikosida dengan molekul glukosa dan banyak terakumulasi pada jenis tumbuhan familia *Compositae*. Mikroba adalah salah satu sumber alternatif untuk menghasilkan inulinase dengan kemampuan katalisis menghasilkan fruktosa murni sebesar 95% (Gill dkk., 2005). Sumber mikroba penghasil enzim inulinase dapat berasal dari golongan jamur seperti *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Chrysosporium* sp, khamir (yeast) *Kluyveromyces*, *Candida* sp, *Debaromyces*, *Saccharomyces* sp dan golongan bakteri seperti dari *Arthrobacter* sp, *Flavobacterium* sp dan *Bacillus* sp (Wijanarka dan Pujiyanto, 2002).

Mikroorganisme adalah sumber yang baik untuk produksi inulinase secara komersil dikarenakan hasil produksi yang tinggi dan budidaya yang sangat mudah (Jeza dkk., 2017). Mengingat pada saat ini penggunaan enzim pada berbagai industri semakin berkembang, baik untuk industri pangan, non pangan dan minuman. Namun, masalah utama terkait produksi fruktosa dari inulin pada skala industri adalah inulin memiliki kelarutan terbatas dan potensi besar terjadi kontaminasi pada temperatur ruang, sehingga proses industri lebih banyak dilakukan pada temperatur 60 °C. Selain itu, sebagian besar aktivitas inulinase mengalami penurunan secara drastis setelah beberapa jam pada temperatur ruang (Gill dkk., 2005). Oleh karena itu, perlu diupayakan minat yang besar melakukan studi melalui metode isolasi dan karakterisasi inulinase yang bersifat termostabil. Studi kultivasi mikroorganisme penghasil inulinase telah banyak menjadi kandidat

yang sangat komersil, seperti dari jamur dan ragi, tetapi bakteri termofilik sebagai penghasil inulinase masih sedikit yang melaporkan (Goa dkk., 2009).

Penelitian bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja sebelumnya telah dilakukan oleh Hafsah (2007), yang berhasil mengidentifikasi 3 genus bakteri penghasil protease, merupakan enzim dengan golongan yang sama dengan inulinase yaitu golongan hidrolase. Genus bakteri yang didapatkan yaitu *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearoformis* dan *Bacillus coagulans*. Penelitian isolasi dan identifikasi bakteri termofilik dari sumber air panas Lejja juga telah dilakukan oleh Arfah dkk. (2014), yang menghasilkan 30 isolat bakteri termofilik dimana 10 diantaranya merupakan isolat penghasil enzim amilase yaitu enzim dengan golongan sama dengan inulinase, sementara 20 isolat yang lainnya belum diidentifikasi, sehingga diperkirakan diantara ke-20 isolat tersebut ada yang merupakan isolat penghasil enzim inulinase.

Azhar dkk. (2013) telah berhasil mengisolasi bakteri pendegradasi inulin dari sumber air panas menggunakan metode *undirect isolation*. Keberhasilan metode *undirect isolation* pada isolasi bakteri pendegradasi inulin menandakan bahwa enzim pendegradasi inulin akan diekspresi jika ada inulin. Inulin berperan sebagai *inducer* dan sumber karbon pada organisme penghasil enzim inulinase (Singh dkk., 2016). Bakteri pendegradasi inulin dapat tumbuh pada media mengandung inulin sebagai satu-satunya sumber karbon karena bakteri pendegradasi inulin mengekspresikan enzim inulinase secara ekstraseluler. Enzim ekstraseluler merupakan enzim yang mengkatalisis reaksi hidrolisis molekul besar seperti selulosa, pati, lipid, gelatin, kitin dan inulin (Azhar dkk., 2017).

Hasil penelitian terkait dengan enzim inulinase juga dilaporkan oleh Saryono (2016) bahwa *Aspergillus niger* Gmn11.1 diisolasi dari umbi dahlia yang

terdapat di daerah Padang Panjang Sumatra Barat, dapat menghasilkan inulinase yang mempunyai aktivitas optimum pada pH 4,6 dan suhu 45 °C, konsentrasi substrat inulin 1% dengan lama inkubasi 15 jam diperoleh aktivitas ekstrak enzim kasar sebesar 0,024 U/mL. Hasil penelitian lainnya dilaporkan oleh Wijanarka dan Pujiyanto (2002), bahwa umbi dahlia dapat menghasilkan 2 isolat bakteri penghasil inulinase. Isolat bakteri tersebut menghasilkan inulinase tertinggi yaitu dengan kondisi fermentasi meliputi konsentrasi inulin 1%, suhu inkubasi 45 °C, pH medium 4,5. Azhar dkk. (2013) melaporkan bahwa sumber air panas Bukit Kili di Solok Sumatra Barat didapatkan 17 isolat bakteri penghasil inulinase. Isolat bakteri UBCT-007 termasuk kelompok *Bacillus licheniformis* memiliki aktivitas enzim inulinase pada suhu 60 °C dan pH 4,5.

Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilakukan, diperoleh isolat bakteri dari sumber air panas Lejja yang memiliki potensi dalam menghasilkan inulinase. Hasil identifikasi pendahuluan memperlihatkan adanya lendir di sekitar koloni bakteri yang tumbuh pada permukaan medium selektif yang mengandung substrat inulin, dapat dilihat pada Lampiran 8. Namun, koloni bakteri yang didapatkan belum diketahui spesies nya. Identifikasi spesies bakteri dapat dilakukan dengan metode 16S rRNA yang memiliki keakuratan tinggi, penggunaan yang luas dan dapat melihat kemiripan antar spesies bakteri (Akihary dan Kolondam, 2020). Begitupun kondisi optimum dalam menghasilkan inulinase dianalisis menggunakan metode RSM yang dapat memilih kondisi proses yang paling optimal tanpa memerlukan data percobaan dalam jumlah yang besar dan tidak membutuhkan waktu lama, maka dari itu penelitian “Isolasi dan Optimalisasi Bakteri Termofilik Penghasil Inulinase dari Sumber Air Panas Lejja Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan” perlu dilakukan.

1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah dari penelitian ini dipaparkan sebagai berikut:

1. apa jenis spesies dari isolat bakteri yang memiliki aktivitas inulinase dari sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan?
2. bagaimana kondisi optimum bakteri termofilik penghasil inulinase dari sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan?

1.3 Maksud dan Tujuan Penelitian

1.3.1 Maksud Penelitian

Maksud dari penelitian ini adalah mengisolasi dan mengidentifikasi jenis spesies serta menentukan kondisi optimum bakteri termofilik penghasil inulinase sumber air panas Lejja, Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan.

1.3.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Melakukan isolasi dan identifikasi spesies bakteri termofilik penghasil inulinase asal sumber air panas Lejja Kabupaten Soppeng, Sulawesi Selatan dengan metode 16S rRNA,
2. menentukan kondisi optimum bakteri termofilik penghasil inulinase yang meliputi konsentrasi substrat inulin, pH dan waktu fermentasi dengan metode RSM.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang diharapkan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. memberikan informasi ilmiah mengenai identifikasi spesies bakteri serta isolasi inulinase dari bakteri termofilik,

2. menambah wawasan ilmiah mengenai peremajaan isolat bakteri dan kondisi optimum dari bakteri termofilik penghasil inulinase yang meliputi penentuan konsentrasi substrat, pH dan waktu fermentasi.
3. meningkatkan minat terhadap pemanfaatan enzim yang bersifat termostabil dalam bidang-bidang industri.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri

Mikroba atau mikroorganisme adalah makhluk hidup yang ukurannya kecil. Mikroorganisme merupakan mikroba yang memiliki ukuran yang kecil, sehingga sulit dilihat dengan mata biasa. Sel mikroba umumnya hanya dapat dilihat dengan alat pembesar atau mikroskop, walaupun demikian ada mikroba yang berukuran besar sehingga dapat dilihat tanpa alat pembesar. Mikroba memiliki susunan sel yang lebih sederhana dibandingkan dengan organisme tingkat tinggi. Mikroba yang ukurannya kurang dari 0,1 mm tidak dapat terlihat dengan mata telanjang. Bakteri merupakan salah satu jenis mikroorganisme yang tidak bisa dilihat oleh mata langsung. Bakteri merupakan organisme yang jumlahnya paling banyak dibandingkan makhluk hidup lain. Bakteri memiliki ratusan ribu spesies yang hidup di darat, laut, udara dan tempat-tempat ekstrim (Rini dan Rochmah, 2020).

Bakteri merupakan organisme yang memiliki dinding sel. Oleh karena itu, jika dikaji dari struktur selnya (kandungan dinding sel), maka bakteri dikelompokkan ke dalam tumbuhan. Jika dikaji dari kemampuan beberapa sel bakteri yang bergerak pindah tempat, maka bakteri dikelompokkan ke dalam hewan. Namun demikian, dalam klasifikasi makhluk hidup dengan sistem lima dunia menurut Whittaker pada tahun 1969, bakteri dikelompokkan ke dalam dunia monera. Bakteriologi memiliki peranan yang cukup besar dalam berbagai kehidupan makhluk hidup lain. Dengan mempelajari kehidupan bakteri, dapat dipergunakan dalam berbagai bidang kehidupan antara lain: kesehatan, makanan, pertanian, lingkungan dan bioteknologi (Boleng, 2015)

2.2 Bakteri Termofilik

Bakteri termofilik merupakan salah satu mikroorganisme yang saat ini memiliki nilai komersial. Bakteri termofilik mampu hidup pada suhu di atas 45 °C dan hidup optimal pada kisaran 55-65 °C. Mikroorganisme termofilik dapat diisolasi dari berbagai sumber, termasuk sumber air panas baik terdapat di darat maupun di laut, tanah yang selalu terkena sinar matahari, bahan yang mengalami fermentasi seperti kompos dan instalasi air panas. Bakteri termofilik merupakan bakteri dengan kemampuan bertahan hidup pada kondisi panas sampai ekstrim panas, pada beberapa literatur bahkan disebutkan ada yang mampu bertahan hidup pada suhu 250 °C. Kemampuan hidupnya pada lingkungan bersuhu tinggi menyebabkan mikroba ini unggul dari mikroba lainnya. Genus dari *Cyanobacteria*, bakteri ungu, bakteri hijau, *Bacillus*, *Clostridium*, *Thiobacillus* dan *Spirochaeta* merupakan kelompok mikroba yang bersifat termofilik (Irdawati dkk., 2011). Menurut Pramiadi dkk. (2014), kisaran suhu pertumbuhan mikroba dapat dikelompokkan menjadi mesofil (13-42 °C) dan termofil (45-100 °C). Kelompok mikroba termofil terbagi menjadi fakultatif dan obligat atau berspora (45-65 °C), ekstrim termofil (65-85 °C) dan hipertermofil adalah mikroba yang mampu bertahan hidup pada kisaran suhu 85-100 °C.

Mikroorganisme termofilik biasa ditemukan pada daerah yang memiliki aktivitas geothermal, seperti daerah pegunungan gunung berapi, sumber air panas, dan juga tempat cadangan minyak bumi atau batu bara. Mikroorganisme ini sangat menarik untuk dikaji dari sudut pandang ilmu dasar maupun terapan. Bidang penelitian dasar yang berhubungan yaitu biologi molekuler, genetika, biokimia, evolusi, taksonomi, ekologi dan asal usul kehidupan. Dari sudut pandang terapan dan bioteknologi, termofil merupakan sumber enzim-enzim yang unik dengan sifat

luar biasa, khususnya yang tahan suhu tinggi (Primiadi dkk., 2014). Mikroorganisme termofilik mampu menghasilkan enzim-enzim termostabil yang sangat potensial untuk aplikasi riset dan industri (Iqbalsyah dkk., 2012)

Mikroorganisme ditemukan hampir di seluruh biosfer, termasuk pada lingkungan dengan suhu, tekanan, salinitas dan pH yang ekstrim. Mikroorganisme termofilik mengandung protein yang tahan panas dan tahan denaturasi sehingga mampu tumbuh dan beradaptasi dengan kondisi lingkungan bersuhu tinggi dan ekstrim. Isolasi bakteri termofilik dari berbagai habitat dengan tujuan penggunaan bakteri dan enzim termostabil yang dihasilkan dari bakteri untuk diterapkan dalam dunia industri semakin intensif. Enzim termostabil mempunyai susunan asam amino berbeda dengan enzim yang sama dari bakteri mesofilik, yaitu banyak mengandung asam amino yang bersifat hidrofobik (Firliani dkk., 2015).

2.3 Enzim Termostabil

Enzim adalah biokatalisator yang banyak digunakan pada berbagai bidang industri produk pertanian, kimia, dan medis. Enzim memiliki sifat-sifat spesifik yang menguntungkan yaitu efisien, selektif, *predictable*, proses reaksi tanpa produk samping, dan ramah terhadap lingkungan. Semenjak ditemukannya organisme yang dapat hidup pada lingkungan yang mempunyai suhu ekstrim, pH ekstrim, tekanan tinggi dan salinitas yang tinggi, hal ini menjadi sangat menarik perhatian pada bidang bioteknologi khususnya tentang potensi enzim yang dihasilkan oleh organisme yang berasal dari lingkungan tersebut. Enzim memegang peranan penting dalam dunia industri pada saat ini, seperti pada industri tekstil, detergen, bahan pangan, minuman, bahan kimia, obat-obatan, prebiotik dan industri kulit (Primiadi dkk., 2014).

Perkembangan bioteknologi pada saat ini sangat maju dan pesat. Salah satu produk bioteknologi yang menjadi primadona sekarang ini adalah enzim. Enzim merupakan biokatalis yang beragam bentuk, ukuran, sifat dan peranannya dalam sel. Berdasarkan peranan enzim dalam sel hewan, tumbuhan dan mikroba, maka enzim berperan dalam setiap reaksi biokimia, yaitu mulai dari konversi energi, metabolisme makanan, mekanisme pertahanan sel, komunikasi antar sel hingga konversi sifat-sifat keturunan. Karena itulah enzim mempunyai potensi bioteknologi yang tinggi dan dapat dimanfaatkan dalam berbagai bidang industri (Muharni dkk., 2013).

Ketersediaan enzim di dalam industri dan bioteknologi cenderung meningkat dan menuntut adanya enzim yang tahan terhadap suhu tinggi. Enzim yang tahan terhadap suhu tinggi dihasilkan oleh mikroorganisme termofilik yang disebut dengan enzim termostabil. Oleh karena itu, enzim yang berasal dari mikroorganisme tersebut kemungkinan dapat digunakan pada industri yang umumnya menggunakan temperatur tinggi dalam proses produksinya (Rusdwitasari dan Wikandari, 2014).

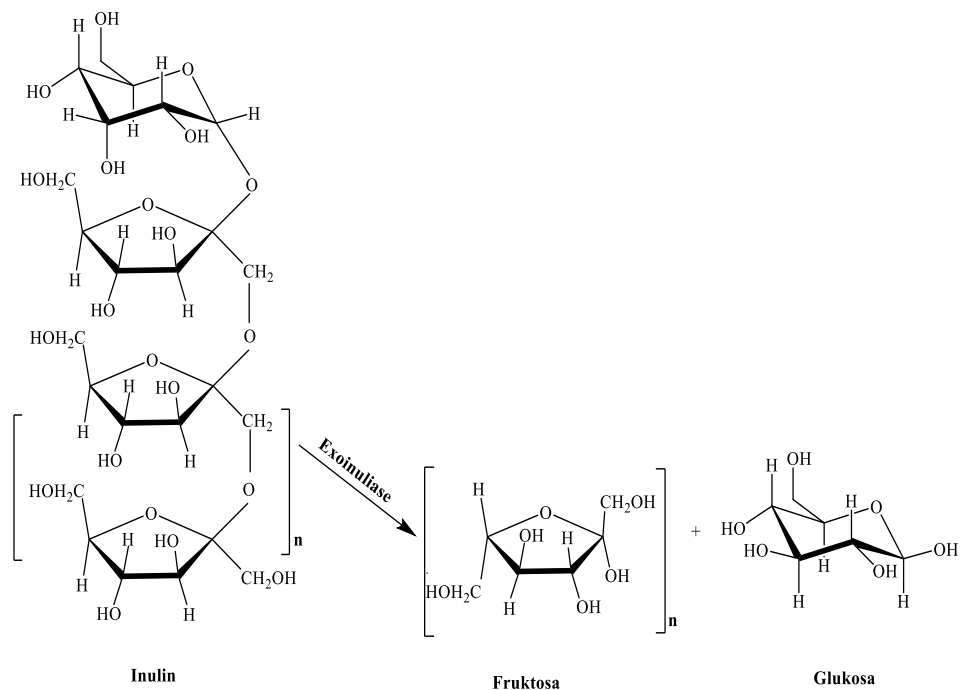
Bakteri termofilik mempunyai potensi untuk menghasilkan enzim termostabil yang sangat penting dalam proses industri dan bioteknologi. Enzim termostabil pada saat ini sedang mendapatkan perhatian besar, karena enzim ini sangat cocok untuk proses industri yang memerlukan suhu tinggi (Rakshit, 2003). Penggunaan enzim termostabil pada beberapa aplikasi sangat efektif dan menguntungkan, seperti dapat meningkatkan kecepatan reaksi, meningkatkan kelarutan reaktan dan produk-produk non volatil serta mengurangi kontaminasi dari mikroba mesofilik (Muharni dkk., 2013).

2.4 Enzim Inulinase

Inulinase adalah enzim yang menghidrolisis inulin menjadi fruktosa atau frukto-oligosakarida. Enzim inulinase dapat dihasilkan oleh beberapa jenis tumbuhan maupun mikroorganisme. Untuk mengisolasi inulinase dalam jumlah yang cukup tinggi dari tumbuhan adalah cukup sulit. Oleh sebab itu, kajian mengenai inulinase mikrobial sangat menarik dan menjadi perhatian banyak peneliti. Enzim-enzim mikrobial banyak digunakan di hampir setiap bidang industri, lebih sering digunakan dibandingkan dengan penggunaan enzim-enzim yang berasal dari hewan atau tanaman. Hal itu disebabkan karena aktivitas yang lebih tinggi, tidak menghasilkan produk samping, lebih stabil dan murah serta dapat diperoleh dalam jumlah yang lebih banyak. Kebanyakan enzim yang akhir-akhir ini digunakan dalam industri makanan dan farmasi adalah enzim mikrobial dan pemanfaatan mikroorganisme untuk memproduksi enzim semakin lebih intensif (Saryono dkk., 2016).

Enzim pendegradasi inulin (inulinase) terbagi dalam dua kelompok, yaitu eksoinulinase dan endoinulinase (EC 3.2.1.7) merupakan enzim yang mampu menghidrolisis inulin menjadi fruktan rantai pendek, yang disebut oligofruktosa (DP 2-10). Sementara itu, eksoinulinase mampu menghidrolisis inulin dan oligofruktosa menjadi unit-unit fruktosa. Penggunaan eksoinulinase mampu mensubstitusi tahap multienzimatis dalam produksi fruktosa dari pati. Enzim inulinase juga dapat dihasilkan secara ekstraseluler maupun intraseluler. Cara sederhana untuk mengetahui hal ini adalah menggunakan analisis kromatografi lapis tipis terhadap supernatan medium yang dimungkinkan mengandung produk hasil hidrolisis inulin (Widodo, 2017).

Hidrolisis inulin secara kimiawi memerlukan biaya tinggi dan menghasilkan senyawa difruktosa anhidrat yang rasanya pahit. Untuk mendapatkan inulinase dari mikrobal yang memiliki potensi komersil industri, enzim ini perlu dimurnikan terlebih dahulu sebelum mempelajari sifat-sifat kinetiknya. Inulinase dari mikroba pertama kali diisolasi dari *Saccharomyces fragilis* pada tahun 1960. Produksi enzim ini umumnya diinduksi oleh inulin, yang merupakan substrat dari inulinase. Aktivitas inulinase banyak ditemukan pada spesies jamur antara lain: *Aspergillus niger*, *Kluyveromyces marxianus*, *Saccharomyces cerevisiae* dan beberapa dari spesies bakteri seperti *Arthrobacter ureafaciens*; *Bacillus stearothermophilus* dan lain-lain. Mekanisme hidrolisis inulin dapat dilihat pada Gambar 1 (Saryono dkk., 2016).



Gambar 1. Hidrolisis inulin oleh exo-inulinase

Sejauh ini diketahui bahwa inulinase dan levanase aktif pada substrat inulin dan levan. Inulinase dari *Bacillus polymyxa* dapat menghidrolisis sukrosa, levan,

raffinosa and inulin. Exoinulinase dari *Aspergillus Awamori* dapat menghidrolisis ikatan β 2,1- sebaik β 2,6 pada *fructooligosaccharides* (inulin dan levan dengan DP 4-7). Levanase dari bakteri *Bacillus subtilis* yang diekspresikan dalam *Escherichia coli* aktif pada levan, inulin dan sukrosa, sementara exolevanase dari *Gluconacetobacter diazotrophicus* SRT4 dapat menghidrolisis levan, inulin dan sukrosa (Azhar dan Oktavia, 2014).

Aksi endo- atau exo- dari inulinase dan levanase pada inulin menghasilkan produk yang berbeda. Produksi fruktosa dari inulin dapat digunakan exoinulinase atau exolevanase, sedangkan untuk memperoleh FOS (*fructooligosaccharides*) dari inulin digunakan endoinulinase atau endolevanase. Kombinasi endo- dan exo- mempunyai efek sinergik untuk menghasilkan fruktosa dari inulin. Kelompok bakteri termofilik yang mengekspresikan inulinase atau levanase termostabil merupakan pilihan yang paling tepat sebagai katalis untuk reaksi hidrolisis inulin dalam memperoleh fruktosa dan prebiotik FOS. Hal ini dikarenakan inulin lebih larut dalam air pada suhu di atas 50 °C. Keuntungan lain penggunaan bakteri ini adalah enzim yang diekspresikan lebih mudah untuk dimurnikan karena perlakuan panas, bersifat termostabil. Selain itu, reaksi enzimatik pada suhu tinggi memungkinkan kelarutan substrat dan kecepatan reaksi makin tinggi, memperendah viskositas, dan memperkecil resiko kontaminasi dengan mikroorganisme lain (Azhar dan Oktavia, 2014).

2.5 Inulin

Inulin merupakan suatu polimer dari unit-unit fruktosa. Inulin bersifat larut di dalam air, tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan, namun difermentasi pada mikroflora kolon (usus besar). Oleh karena itu, inulin berfungsi sebagai

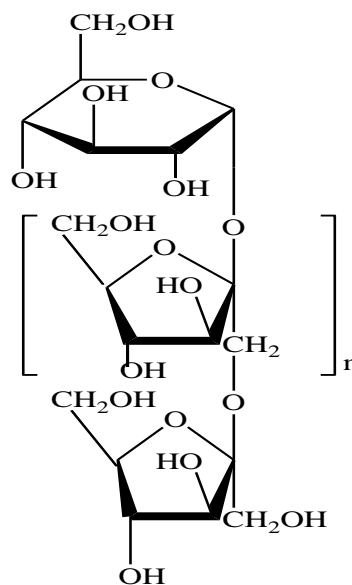
prebiotik. Prebiotik merupakan komponen pangan yang berfungsi sebagai substrat mikroflora yang menguntungkan di dalam usus. Komponen pangan yang mempunyai sifat prebiotik antara lain inulin, fruktooligosakarida, galaktooligosakarida dan laktosa (Widowati, 2007).

Inulin terdapat pada umbi dahlia (*Dahlia* sp. L), 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, gandum dan barley. Dalam bidang farmasi, inulin digunakan untuk uji fungsi ginjal. Inulin juga dapat digunakan untuk pembuatan etanol dan bioplastik. Kandungan serat pangan terlarut (*Soluble Dietary Fiber*) dalam inulin sangat bermanfaat bagi pencernaan dan kesehatan tubuh. Inulin bersifat larut dalam air namun tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim dalam sistem pencernaan mamalia sehingga mencapai usus besar tanpa mengalami perubahan struktur. Meskipun demikian, inulin dapat mengalami fermentasi akibat aktivitas mikroflora yang terdapat di dalam usus besar, sehingga berimplikasi positif terhadap kesehatan tubuh. Inulin yang digunakan oleh industri pangan di Indonesia seluruhnya masih diimpor. Untuk mengurangi produk impor dan menggali potensi manfaat tanaman lokal telah dilakukan evaluasi sifat inulin dari berbagai jenis dahlia (Widowati, 2007).

Inulin merupakan salah satu komponen bahan pangan dengan kandungan serat pangannya yang sangat tinggi (>90%), dimanfaatkan di dalam pangan fungsional. Inulin sangat luas penggunaannya di dalam bidang industri pangan baik di Kanada, USA dan Eropa. Pemanfaatan inulin tersebut sebagai pengganti gula dan lemak yang menghasilkan kalori lebih rendah. Inulin dapat digunakan sebagai komponen dari diet rendah lemak dan produk-produk rendah lemak. Konsumsi

inulin dapat meningkatkan secara nyata bakteri yang bermanfaat, yaitu *Bifidobacterium* (Indriyanti dkk., 2015).

Inulin adalah polimer alami kelompok karbohidrat dengan monomer fruktosa. Antara monomer fruktosa pada inulin dihubungkan oleh residu ikatan-2,1- β -D-fructofuranosyl. Tiap ujung pereduksi untai polimer inulin dapat hadir glukosa. Oleh sebab itu polimer inulin dapat ditulis GF_n yaitu fruktan dengan ujung terminal glukosa atau F_n yaitu fruktan tanpa ujung terminal glukosa. Simbol n pada rumus tersebut adalah derajat polimerisasi (DP). $2 < DP < 10$ yang dikenal sebagai oligofruktosa. Dengan demikian hidrolisis sempurna inulin menghasilkan fruktosa dan glukosa, jika diasumsikan tiap ujung molekul inulin terikat satu residu glukosa (Azhar dan Oktavia, 2014). Struktur inulin dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Struktur Inulin

Inulin berperan sebagai prebiotik, dimana inulin mampu melewati saluran pencernaan atas dan mencapai usus besar, sehingga dianggap sebagai *colonic foods* bagi mikroflora usus. Inulin juga berperan sebagai serat pangan yang tahan terhadap

proses pencernaan dan penyerapan di dalam usus kecil manusia melalui fermentasi di usus besar. Hasil fermentasi inulin di usus besar adalah asam lemak rantai pendek yang terdiri dari asetat, propionate dan butirat. Peranan butirat adalah mempertahankan pH mukosa usus (Coxam, 2005).

Senyawa inulin jika dikonsumsi mencapai usus besar dalam keadaan struktur yang tidak berubah. Selanjutnya inulin segera difermentasi mikroflora yang ada di dalam usus besar menjadi asam lemak rantai pendek dan dari beberapa mikroflora spesifikakan dihasilkan asam laktat. Kondisi demikian menurunkan derajat keasaman (pH) pada usus besar. Asam laktat di dalam usus besar merangsang gerak peristaltik usus, sehingga dapat mencegah konstipasi atau sembelit. Sifat fisiologis inulin, yaitu inulin tidak dapat dicerna oleh enzim-enzim pencernaan sehingga mencapai usus besar tanpa mengalami perubahan kimiawi (Coxam, 2005).

2.6 Metode *Response Surface Methodology* (RSM)

Secara umum tujuan suatu eksperimen adalah untuk memperoleh keterangan tentang bagaimana respon yang diberikan oleh suatu obyek pada berbagai keadaan tertentu yang ingin diperhatikan. Keadaan tertentu biasanya merupakan sesuatu yang sengaja diciptakan atau ditimbulkan, baik melalui pemberian perlakuan atau pengaturan keadaan lingkungan. Meskipun pemberian perlakuan telah ditentukan dan keadaan lingkungan telah diatur dengan cermat, penelaahan mengenai respon tidak akan luput dari gangguan keragaman alami yang ada pada setiap obyek serta pengaruh berbagai faktor yang memang tidak dapat dibuat persis sama bagi setiap obyek dalam eksperimen. Proses yang optimum

dipengaruhi oleh sejumlah variabel, sering diperlukan data-data percobaan dalam jumlah besar dan membutuhkan waktu lama, yang otomatis akan memerlukan biaya dalam jumlah yang besar. Beberapa teknik statistika sering dipakai untuk melakukan pendekatan guna memperoleh pemahaman terhadap kondisi optimum dari suatu proses, tanpa memerlukan data yang terlampau banyak. Diantara metode yang sering dipakai adalah metode permukaan respon (Nuryanti dan Salimy, 2008).

Metode permukaan respon (*response surface methodology*) merupakan sekumpulan Teknik matematika dan statistika yang berguna untuk menganalisis permasalahan dimana beberapa variabel independen mempengaruhi variabel respon dan tujuan akhirnya adalah untuk mengoptimalkan respon yang didapatkan. Ide dasar metode ini adalah memanfaatkan desain eksperimen statistika untuk mencari nilai optimal dari suatu respon. Metode ini pertama kali diajukan sejak tahun 1951 dan sampai saat ini telah banyak dimanfaatkan dan digunakan baik dalam dunia penelitian maupun aplikasi industri. Metode RSM ini diharapkan dapat membantu untuk menentukan kondisi operasi yang optimum (Octaviani dkk., 2017)

Pada dasarnya analisis permukaan respons serupa dengan analisis regresi yaitu menggunakan prosedur pendugaan parameter model fungsi respons berdasarkan metode kuadrat terkecil (*Least Square Method*). Perbedaannya dengan regresi linear adalah dalam analisis respons diperluas dengan menerapkan teknik-teknik matematika untuk menentukan titik-titik optimum agar dapat ditentukan respons yang optimum. RSM dapat digunakan untuk menyelidiki dan memilih kondisi proses yang paling optimal. Selain itu, keunggulan metode RSM ini di antaranya tidak memerlukan data percobaan dalam jumlah yang besar dan tidak membutuhkan waktu yang lama sehingga memiliki nilai keefektifan yang tinggi (Prabudi dkk., 2018).