

Identifikasi dan Karakterisasi Isolat 23 Ducc Serta Kemampuannya dalam Memproduksi Enzim Inulinase

Wijanarka ¹⁾; Endang K ²⁾ dan Hermin ³⁾

¹⁾ Lab. Mikrobiologi; ²⁾ Lab. Biokimia dan ³⁾ Lab. Genetika. dan staf pengajar FMIPA-
Jurusan Biologi Universitas Diponegoro Semarang. Contact person Hp. 08179526187.
E-mail: Wied_bio_undip@telkom.net

Abstract

Inulinase has a capacity to convert inulin into fructose hence it could be used in high fructose syrup production. Inulinase is not readily available in Indonesian market. This enzyme could be obtained from thermotolerant yeast found in *Dahlia variabilis*. Therefore this study was conducted to identify inulinolytic yeast in *D. variabilis*. The results showed that an inulinolytic yeast isolate 23 DUCC from *D. variabilis* tubers was found. The inulinolytic yeast produces inulinase (E.C.3.2.1.7). Based on the identification and determination, the isolate is known to be *Kluyveromyces marxianus*. The best optimization condition for this yeast was as follows: concentration of carbon source (inulin) was 0.75%, pH was 5.5 and time of fermentation was 53 hours. In such condition *K. marxianus* produced inulinase up to 0.6481 IU.

Key words: *K. marxianus*, inulinase, *Dahlia variabilis*

Pendahuluan

Jumlah penduduk Indonesia dari tahun ke tahun cenderung meningkat sehingga konsumsi gula pun ikut meningkat. Di sisi lain, produksi gula secara nasional belum dapat memenuhi tingkat konsumsi gula di Indonesia. Hal ini terbukti dengan adanya impor gula oleh pemerintah berupa gula cair dan gula kristal, yang tiap tahun mencapai rata-rata sebesar 2 juta ton (Tjokroadikoesoemo, 1986; Mangunwijaya, 1993). Keadaan inilah yang mendorong upaya untuk mencari aneka jenis bahan untuk digunakan sebagai pemanis sehingga kemudian banyak diproduksi pemanis sintetis. Pemanis sintetis ini meskipun memiliki tingkat kemanisan lebih tinggi daripada pemanis alami, ternyata membahayakan bagi kesehatan karena bersifat karsinogenik.

Dua jenis sumber pemanis alami yang telah ada sekarang ini adalah gula kristal dan gula cair (dari pati). Pemanis alami yang dihasilkan dari bahan dasar amilum dapat berupa gula cair fruktosa atau *high fructose syrup (HFS)* dan melalui beberapa tahapan proses enzimatik sehingga tidak efektif dan efisien. Pembuatan *HFS* secara konvensional adalah dengan menghidrolisis amilum menjadi glukosa kemudian dilakukan isomerisasi menjadi fruktosa menggunakan enzim glukosa isomerase. Sirup fruktosa juga dapat dibuat dari bahan dasar inulin dengan cara dihidrolisis menggunakan asam atau enzim inulinase (Byun dan Nahjm, 1978; Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1988).

Inulinase (E.C.3.2.1.7) yang juga dikenal sebagai 2,1 β -D- fruktafruktanohidrolase banyak dihasilkan oleh beberapa khamir seperti *Candida kefir*, *C. salmanticensis*, *Debaromyces cantarellii*, *D. phaffii*, *Kluyveromyces fragilis*, (Guiraud *et al.*, 1982). Enzim ini mempunyai kemampuan untuk mengubah inulin menjadi unit-unit fruktosa. Dengan adanya penggunaan enzim ini, maka proses pembuatan *HFS* menjadi lebih menguntungkan karena prosesnya cepat, efisien, ekonomis, dan berlangsung dengan satu tahap saja.

Pemanis alami seperti *HFS* memiliki peluang pasar yang baik untuk dikembangkan pengadaannya. Namun, produksi *HFS* di Indonesia saat ini belum dapat berkembang dengan baik karena (1) belum ada produsen enzim inulinase, (2) biaya untuk mengimpor enzim ini sangat mahal, (3) enzim yang dihasilkan sangat sedikit, (4) hidrolisis inulin menjadi fruktosa menggunakan asam pada suhu tinggi akan menghasilkan fraksi warna yang gelap serta hasil samping yang tidak diinginkan seperti difruktofuranoanhidrida (Allais *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1998). Upaya mengatasi masalah tersebut akhir-akhir ini dipusatkan terhadap sumber pemanis alami hasil biosintesis dari mikroorganisme dengan

alasan mudah dimanipulasi secara genetik dan murah operasionalnya. Sumber pemanis alami tersebut dapat dihasilkan oleh khamir (*yeast*) termotoleran *indigenous* inulinolitik. Khamir ini secara alami ada pada umbi dahlia dan mempunyai enzim inulinase yang mampu mengubah inulin menjadi fruktosa sebagai bahan dasar pembuatan *HFS*.

Beberapa keuntungan pada pembuatan *HFS* menggunakan enzim inulinase adalah dapat memperpendek jalur biosintesis (dari tiga tahap menjadi satu tahap proses) dan hanya menggunakan satu enzim yaitu inulinase.

Khamir termotoleran *indigenous* inulinolitik diisolasi dari *tropical bioresources* pada tanaman *Dahlia variabilis* Willd di Pulau Jawa. Isolat khamir terpilih akan diuji kemampuannya dalam menghasilkan enzim inulinase.

Materi dan Metode

Dalam penelitian ini digunakan isolat 23 koleksi Wijanarka dari umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd.); inulin murni; medium produksi inulinase; pepton (Pronadisa); *dinitrosalicylic acid*, dan sodium asetat. Identifikasi khamir dilakukan menggunakan medium medium menurut Kurtzman dan Fell (1998), yang terdiri atas *yeast extract malt agar* (YMA), *yeast extract malt broth* (YMB), *corn meal agar* (CMA), *yeast extract peptone* (YEP), *yeast extract peptone agar* (YEPA), *yeast nitrogen base* (YNB), *yeast carbon base* (YCB), *Christensen's urea agar* (CUA), potato dextrose agar (PDA). Medium produksi dibuat dari bahan-bahan sebagai berikut: 1 g/100 mL inulin; 0,5 g/100 mL (NH₄)₂HPO₄; 0,05 g/100 mL MgSO₄.7H₂O; 0,015 g/100mL FeSO₄.7H₂O, dan pH 5,0 (Byun dand Nahm, 1978). Starter dibuat dengan menginokulasikan satu ose biakan isolat 23 berumur 3 hari ke dalam 50 mL medium produksi dan diagitasi 150 rpm selama 22 jam.

Produksi enzim, dilakukan dengan menginokulasikan starter 10% (v/v) pada medium produksi enzim. Supernatan hasil sentrifugasi merupakan enzim kasar inulinase untuk penentuan aktivitas inulinase.

Penentuan aktivitas inulinase (Xiao et al., 1998; Ertan et al., 2003) didasarkan atas jumlah gula reduksi yang terbentuk dengan menghitung absorbansi enzim-substrat (ES) dikurangi substrat (S) dan enzim (E). ES dibuat dari 0,5 mL substrat inulin 1%; 0,4 mL bufer, dan 0,1 mL enzim kasar. S dibuat dari 0,5 mL substrat inulin 1%; 0,4 mL bufer; 0,1 mL akuades. E dibuat dari 0,4 mL bufer; 0,1 mL enzim kasar dan 0,5 mL akuades. Tiap campuran diinkubasi 30 menit (50°C). Reaksi dihentikan dengan memasukkan tabung sampel ke dalam air mendidih selama 5 menit. Setelah dingin, ditambahkan 1 mL DNS, lalu dipanaskan ke dalam air mendidih selama 10 menit, dan setelah dingin ditambahkan 5 mL akuades. Pengukuran absorbansi dilakukan pada λ_{570} nm.

Aktivitas inulinase dianalisis dengan metode DNS (Chaplin dan Kennedy, 1994) dan ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μ mol gula reduksi yang dibebaskan per menit pada kondisi tertentu.

Hasil dan Pembahasan

Identifikasi isolat 23 DUCC, yang meliputi uji fisiologi-biokimia dan karakteristik morfologi, menghasilkan data seperti pada Tabel 1 dan 2.

Tabel 1. Hasil pengamatan morfologi isolat 23 DUCC
Table 1. Observation on the morphology of isolate 23 DUCC

Pengamatan	Isolat 23 DUCC
Bentuk sel (MEB)	bulat sampai silindris, sel terdapat dalam bentuk tunggal atau berpasangan atau dalam rantai pendek.
Ukuran sel (MEB)	P (2-5) x L (3-6) μ m
Pertunasan (MEB)	multipolar
Miselium palsu dan miselium sejati	membentuk <i>pseudomycelium</i> yang bercabang

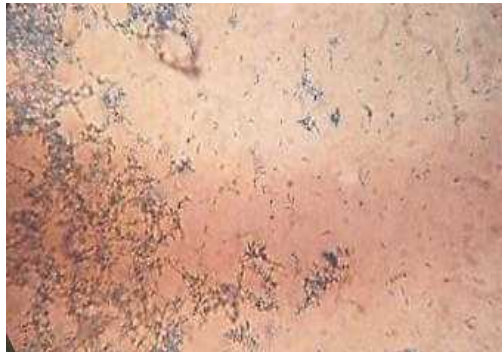
(CMA)	sangat baik, tidak menghasilkan hifa sejati (<i>true mycelium</i>).
Penampakan koloni (YMA)	putih agak krem dan menjadi kecoklatan pada biakan tua, tekstur kusam seperti mentega, profil koloni berkerut, tepi koloni bergerigi.
Penampakan koloni (YMB)	membentuk sedimen, tetapi tidak ada pelikel.
Spora seksual	askospora berbentuk bulat sampai semibulat, askus tidak mudah pecah dan terlihat pada hari ke-15 pada YMB dan PDA. Jumlah askospora satu sampai 12 dalam setiap askus.

Tabel 2. Uji fisiologi/biokimia isolat 23 Ducc
 Table 2. Physiological/biochemical assay on isolate 23 Ducc

Uji	Isolat 23 Ducc
Fermentasi (YEP)	<i>positif</i> : glukosa (s), sukrosa (s), rafinosa (s), <i>negatif</i> : galaktosa, maltosa, laktosa, melibiosa, trehalosa
Asimilasi C (YNB)	<i>positif</i> : eritritol, ribitol (adonitol), dulcitol (galakstitol), D-manitol, D-glusitol (D-sorbitol), α -metil-D-glukosida, salisin, glukono- δ -laktone, 2-asam ketoglukonat, 5-asam ketoglukonat. <i>negatif</i> : glukosa, galaktosa, L-sorbosa, sukrosa, maltosa, selobiosa, trehalosa, laktosa, melibiosa, rafinosa, melezitosa, inulin, <i>soluble starch</i> , D-xilosa, L-arabinosa, D-arabinosa, D-ribosa, L-ramnosa, metanol, etanol, gliserol, D-L-asam laktat, asam suksinat, asam sitrat, inositol, asam D-glukuronat, asam D-galakturonat, arbutin, minyak parafin, D-glukosamin, N-asetil-D-glukosamin, heksadekana.
Asimilasi N (YCB)	<i>positif</i> : kalium nitrat, natrium nitrit, L-lisin, kadaverina, kreatin, kreatinin, D-glukosamin, imidazol, tirosin, kasein, hipoxantin, N-asetil-D-glukosamin. <i>negatif</i> : amonium sulfat, etilamin-HCl.
Pembentukan enzim urease (CUA)	<i>negatif</i>
Pertumbuhan pada suhu 27°C (YMA)	<i>positif</i>
Pertumbuhan pada suhu 37°C (YMA)	<i>positif</i>
Pertumbuhan pada medium 60% sukrosa (YEPA)	<i>positif</i>

Berdasarkan karakter morfologi dan hasil uji fisiologi/biokimia yang diamati disimpulkan bahwa khamir isolat 23 Ducc adalah *K. marxianus* (E.C. Hansen) van der Walt (Gambar 1).

Kondisi lingkungan untuk produksi inulinase oleh khamir *Kluyveromyces marxianus* ini adalah pH medium 5,5 dan umur pemanenan 53 jam. Berdasarkan analisis ragam atau ANOVA diketahui bahwa produksi inulinase sangat dipengaruhi oleh konsentrasi karbon/inulin (C) tetapi untuk konsentrasi nitrogen (N) dan interaksinya (CN) tidak memberikan pengaruh (Tabel 3).



Gambar 1. Isolat 23 DUCC
Figure 1. Isolate of 23 DUCC

Setelah dilakukan uji lanjut (uji t), konsentrasi inulin 0,75% (C3) memberikan pengaruh yang lebih nyata dengan aktivitas enzim inulinase sebesar 0,6481 IU bila dibandingkan dengan konsentrasi 0,50% (C2) dan 0,25% (C1) (Tabel 4). Aktivitas ini meningkat sebesar 1,3 kali bila dibandingkan dengan sebelum kondisi optimasi (0,497 IU). Hal ini membuktikan bahwa inulin sangat mempengaruhi produksi inulinase, dan enzim ini hanya dapat dihasilkan apabila ada rangsangan/induser yang berasal dari luar. Hal ini di dukung oleh pernyataan Park dan Yun (2001) bahwa inulinase diproduksi secara ekstraseluler dan bersifat inducibel.

Tabel 3. ANOVA isolat *K. marxianus*
Table 3. Anova of *K. marxianus* isolate

SK	DB	JK	KT	Fhit	Ftab (0,05)
Perlakuan	8	0,2220	0,0278	2,3138	2,51
Konsentrasi Inulin	2	0,1427	0,0714	5,9508**	3,55
Konsentrasi Nitrogen	2	0,0282	0,0141	1,1763	3,55
Interaksi	4	0,0511	0,0128	1,0641	2,93
Galat	18	0,2159	0,0120		
Total	26				

** F Hitung (P) > F Tabel (0,05) maka berbeda nyata

Tabel 4. Analisis lanjut pengaruh Konsentrasi inulin pada isolat *K. marxianus*
Table 4. Analysis of the effect of Inulin concentration on *K. marxianus* isolate

Konsentrasi Inulin	Rata-rata	beda dengan		
		0,25%	0,50%	0,75%
0,25%	0,4795	-	-	-
0,50%	0,6133	0,1338*	-	-
0,75%	0,6481	0,1686**	0,0348	-
		BNT (18; 0,05)	BNT (18; 0,01)	
		0,10849	0,14862	

Kesimpulan

Berdasarkan hasil uji identifikasi, determinasi, dan karakterisasi diketahui bahwa isolat 23 DUCC adalah *K. marxianus*. Pada kondisi optimasi sumber karbon inulin 0,75%, pH 5,5 (C3), dan umur 53 jam *K. marxianus* menghasilkan aktivitas inulinase sebesar 0,6481 IU.

Ucapan Terima Kasih

Penulis/peneliti mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Program Insentif Riset Terapan-Menristek Tahun Anggaran 2007 yang telah memberikan bantuan dana bagi terlaksananya penelitian ini.

Daftar Pustaka

- Allains, J.J., Kammou S., Blanc P., Girard C., and Baratti, J. 1986. Isolation and characteristic of bacterial strains with inulinase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (50): 1086-1090.
- Allains, J.J., Hoyos-Lopez G., Kammoun S., and Baratti J. 1987. Isolation and characterization of thermophilic bacterial strains with inulinase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (5) : 942 –945.
- Baltz. R.H. 1996. Strain Improvement. *dalam* Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain, A.I., and Solomon, N.A. (Ed). American Society for Microbiology, Washington.
- Barnett, J.A., Oayne, R.W., and Yarrow, D. 1990. Yeasts: Characteristics and Identification. 2nd Edition. Cambridge Univ. Press. Cambridge
- Bajpai, P. and Margaritis, A. 1987. Characterization of molecular sieve-bound inulinase. *J. Ferment Technol.* 65 (2): 239 – 247.
- Bucke, C. 1988. Enzymes in Fructose Manufacture *dalam* Enzymes and food Processing. Applied. Science. Pub. Ltd.
- Byun, S.M. and Nahm, B.H. 1987. Production of fructose from *Jerusalem artichoke* by enzymatic hydrolysis. *J. Food Sci.* 43: 1871 – 1873.
- Chaplin, M.F. and Kennedy, J.F. 1994. Carbohydrate Analysis: a Practical Approach. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Cruegur, W and Crueger, A. 1984. Biotechnology: a Textbook of Industrial Microbiology. Thomas (Ed) Sinauer Associated, Inc. Sunderland, M.A 01375.
- De Lenheer, L. and H. Hoebregs. 1994. Inulin. Megazyme International Ireland Ltd. Ireland.
- Deutscher, M. 1990. Guide To Protein Purification. Methods in Enzymology Vol. 182. Academic Press. Inc. Boston. Toronto. Tokyo.
- Doty, T. and Vaninen. 1979 The Properties, Manufacture and Uses as an Industrial Raw Material. Dalam : C.G. Birch dan K.J. Parker (ed) Sugar : Science and Technology Appl. Sci Publ. London
- Dixon, M. and Webb, E. 1979. Enzymes. Logman Group Ltd., London
- Hartiko, H. 1994. Biologi Organisme Termofilik. PAU-Bioteknologi UGM. Jogjakarta.
- Holz, G. and Saunders, G. 1985. Genetic Modification of Industrial Microorganisms *dalam* Comprehensive Biotechnology. The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agryculture and Medicine. Moo-Young, M (Ed) Pergamon Press.
- Javadekar, V.S., Siva H., Raman, and Gokhale D.. 1995. Industrial yeast strain improvement: construction of a highly flocculent yeast with a killer character by protoplast fusion. *Jour. Indst. Microbiology* 15: 94-102.
- Kockova-Kratochilova, A. 1990. Yeast and Yeast Like Organism. VCH. Publishers. France. Pp. 6 – 7, 42 – 51.
- Kreger-van Rij, N.J.W. 1984. The Yeast, a Taxonomic Study. Third revised and Enlarged Ed., Elsevier sci. publ. B.v., Amsterdam.

- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. 1998. *The Yeasts: a Taxonomic Study*. 4th ed. Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam.
- Lutony, T.L. 1993. *Tanaman Sumber Pemanis*. Penebar Swadaya, Jakarta.
- Matsushima, R and Baltz, R.H. 1986. Protoplast Fusion *dalam* Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology. Demain, A.L. and Solomon, N.A. American Society for Microbiology . Washington DC.
- Mayes, P.A., Daryl, K.G., Victor, W.R. and David, W.M. 1987. *Biokimia Harper* (Terjemahan Iyan Darmawan). Penerbit Buku Kedokteran EGC, Jakarta.
- Moat, A.G. and Foster, J.W. 1988. *Microbial Physiology*. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Nagy, I., Palagyi Z., Vagvolgyi C. and Ferenczy L., 1994. Genomic comparison among wild-type and mutant strains of *P. rhodozyma*. *FEMS Microbiology. Lett.* 123: 315-318.
- Panji, C. 1985. *Penuntun Praktikum Bioindustri*. PAU IPB. Bogor.
- Park, J.P. and Yun J.W., 2001. Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production. *Letters in Applied Microbiology* (33): 183 – 187.
- Park, S., Jeong H.Y., Kim H.S., and Yang. M.S. 2001. Enhanced production of *Aspergillus ficuum* endoinulinase in *Saccharomyces cerevisiae* by using the SUC 2 deletion mutation. *Enzyme and Microbial Technology* 29 (2-3): 107-110
- Pessoa, A. and Vitolo M.. 1999. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and Enzyme Extraction. *Braz. J. Chem. Eng.* 16 (3): doi: 10.1590/S0104-66321999000300003
- Perkins, S. 1984. *Biotechnology: a New Industrial Revolution*. Orbis Publishing, London.
- Rouwenhorst, R.J., Visser L.E., van Derbaan A.A., Scheffer W.A., and van Dijken J.P.. 1988. Production, distribution and kinetic properties of inulinase in continuous culture of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(5): 1131 - 1137.
- Rouwenhorst, R.J., Ritmeester W.S., Scheffer W.A., and van Dijken J.P. 1990a. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* sp. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (11): 3329 – 3336.
- Rouwenhorst, R.J., Hensing M., Verbakel J., Scheffer W.A. and van Dijken J.P. 1990b. Structure and properties of the extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (11): 3337 – 3345.
- Rukmana, R. 2000. *Dahlia: Prospek Agribisnis dan Teknik Budi Daya*. Penerbit Kanisius, Yogyakarta.
- Santiago, C.M. 1982. Protoplast fusion: a new technique for genetic manipulation and breeding of industrial microorganism. *I.C. Biotech.* 5: 435-440.
- Tjokroadikoesoemo, P.S. 1986. *HFS dan Industri Ubi Kayu Lainnya*. Penerbit PT Gramedia, Jakarta.
- Wijanarka, Arina, T.L, dan Emi, Y. 2001. Seleksi Khamir dan Optimasi Produksi Enzim Inulinase dari Tanah Sekitar Umbi Ketela Rambat (*Ipomoea batatas*) di Daerah Bandungan Ambarawa. *Penelitian BBI Dosen Muda*.
- Wijanarka dan Sri, P. 2002. Isolasi Bakteri Termofilik dalam Menghasilkan Enzim Inulinase Termotabil dari Tanah Sekitar Umbi Dahlia (*Dahlia* sp) di Daerah Bandungan Ambarawa. *Penelitian Dosen Muda*.

- Hermin, P.S., Wijanarka, Endang, K., dan Hermin, P. 2003. Peningkatan Biosintesis Karotenoid pada *Phaffia rhodozyma* melalui Fusi Protoplas dalam Upaya Diversifikasi Pakan Buatan pada Sektor Akuakultur. Penelitian Dasar.
- Wijanarka, Kusdiyantini, E., dan Hermin, P.S. 2004. Fusi Protoplas Interspecific *Kluyveromyces marxianus* dan *Torulospira pretoriensis* Authotonus untuk Produksi Enzim Inulinase Termostabil. Penelitian Dasar.
- Wijanarka, Arina, T.L., dan Hermin, P.S. 2004. Fusi Protoplas Khamir Inulinolitik *Kluyveromyces marxianus* dan *Torulospira pretoriensis* Isolat Lokal serta Aplikasinya pada HFS. Penelitian Terapan.
- Xiao, R., Tanida M. and Takao S.. 1998. Inulinase from *Cryosporium pannorum* J. Ferment. Technol. 66 (5): 244 – 248.
- Xiao, R., Tanida M. and Takao S.. 1989. Purification and some properties of endoinulinase from *Cryosporium pannorum* J. Ferment. Bioeng 67 (4): 244.