

Optimasi Starter Dalam Memproduksi Inulinase Dan Identifikasi Khamir Inulinolitik BAN - 1 Dari Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis* Willd)

Wijanarka¹⁾; Endang Kusdiyantini²⁾ dan Hermin³⁾

¹⁾ Lab. Mikrobiologi; ²⁾ Lab. Biokimia dan ³⁾ Lab. Genetika. Dan Staf Pengajar FMIPA-
Jurusan Biologi Universitas Diponegoro Semarang. Contact person Hp. 08179526187
Email: Wied_bio_undip@telkom.net

ABSTRACT

Inulinolytic yeast isolated from dahlia tuber (*Dahlia variabilis* Willd) of Bandungan-Ambarawa, was found to produce inulinase enzyme (E.C.3.2.1.7). Under tested fermentation condition, BAN-1 inulinase isolate showed enzymatic activity in dose dependent manner to the starter concentration. A maximum enzymatic activity of 0.582 IU was produced by adding starter concentration 10%. Based on morphological, physiological and biochemical evaluation it was identified that the BAN-1 isolate is *Pichia sp.*

Key words: Inulinase; *Pichia sp.*, *Dahlia variabilis* Willd

Pendahuluan

Produksi gula secara nasional masih tergantung pada gula tebu dan gula cair dari pati sehingga belum memenuhi tingkat konsumsi gula di Indonesia. Hal ini terbukti dengan impor gula oleh pemerintah, berupa gula cair dan gula kristal tiap tahun rata-rata 2 juta ton (Manggunwidjaya, 1993). Keadaan inilah yang mendorong upaya mencari aneka jenis bahan untuk digunakan sebagai pemanis, hingga kemudian banyak diproduksi pemanis sintesis (berbahaya untuk kesehatan) dari pada pemanis alami. Pemanis alami mempunyai peluang pasar yang baik untuk dikembangkan pengadaannya. Keberadaannya memiliki prospek yang menantang untuk digarap baik dalam budidaya sumber tanaman pemanisnya maupun industri pengolahannya. Sumber gula baru sebagai alternative untuk mengurangi ketergantungan terhadap gula tebu perlu dicari dan fruktosa merupakan salah satu alternative yang penting. Selanjutnya fruktosa ini dapat dibuat pemanis alami yang dikenal sebagai *HFS (High Fructose Syrup)*. Pemanis alami seperti *HFS (High Fructose Syrup = Sirup fruktosa)* memiliki peluang pasar yang baik untuk dikembangkan pengadaannya.

Upaya mengatasi masalah ini, akhir-akhir ini perhatian dipusatkan terhadap sumber pemanis alami hasil biosintesis dari mikroorganisme dengan alasan mudah dimanipulasi genetik dan murah operasionalnya. Sumber pemanis alami (inulin) tersebut dapat berasal dari umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) dengan bantuan khamir (*yeast*) inulinolitik. Inulin adalah polisakarida yang terkandung dalam umbi dahlia, chicory, Jerusalem artichoke dan lain-lain. Struktur kimia inulin adalah linier, polimer dari 2,1 linkage fruktosa yang ujungnya berupa residu sukrosa. Fruktosa yang menyusun inulin dapat dihidrolisis dengan asam maupun secara enzimatis (Haraguchi *et al.*, 1990; Ertan *et al.*, 2003). Khamir inulinolitik mempunyai enzim inulinase (2,1 β -D-fructofuranohydrolyse E.C.3.2.1.7) yang mampu mengubah inulin menjadi fruktosa sebagai bahan dasar pembuatan *HFS*.

Materi dan Metode

Mikroorganisme. Isolat khamir inulinolitik BAN-1 hasil isolasi dari umbi dahlia (*Dahlia variabilis* Willd) asal Bandungan – Ambarawa. Cara kerja screening untuk

mendapatkan isolate tersebut dengan menggunakan inulin murni sebagai satu-satunya sumber karbon (Ertan *et al.*, 2003).

Kultivikasi medium. Komposisi medium untuk produksi enzim (Byun and Nahm, 1978) yaitu : Inulin (Sigma) 1%; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,5% ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05%; FeSO_4 0,015%; agar 2% dan pH medium 5,0. Medium di autoklaf pada suhu 121 °C selama 20 menit. Setelah diinokulasi, Erlenmeyer di *rotary shaker* pada suhu 28°C dengan kecepatan 150 rpm.

Enzyme Assay. Sebanyak 0,1 ml larutan enzim dicampur dengan substrat inulin 0,1% dalam larutan bufer sodium asetat pH 5. Selanjutnya diinkubasi selama 30 menit pada suhu 50°C. Gula reduksi yang terbentuk ditentukan dengan metode DNS (Chaplin, 1994; Xiao, *et al.*, 1998; Park dan Yun, 2001). Aktivitas inulinase ditentukan berdasarkan sejumlah 1 μmol gula reduksi (fruktosa) yang dibebaskan permenit pada kondisi tertentu.

Identifikasi khamir inulinolitik Identifikasi khamir BAN-1 sebagai isolat terpilih ditentukan berdasarkan pengamatan morfologi dan uji fisiologi/biokimia (Barnett, 1983; Kurzman dan Fell, 1998).

Hasil dan Pembahasan

Kondisi fermentasi yang dilakukan dalam penelitian ini yaitu konsentrasi sumber C 0,75 % inulin, waktu inkubasi 24 jam, konsentrasi nitrogen 0,25%, pH medium 5,0 dan variasi konsentrasi inokulum (5%, 0,75% dan 10%) terhadap aktivitas inulinase isolat BAN- 1.

Berdasarkan penelitian yang dilakukan, ternyata semakin besar konsentrasi starter yang ditambahkan pada medium fermentasi maka produksi enzim juga semakin besar (Tabel 1). Hal ini ditandai dengan besarnya peningkatan aktivitas enzim. Isolat BAN-1 pada konsentrasi starter 10% menghasilkan aktivitas 0,582 IU. Peningkatan ini diakibatkan jumlah inokulum yang ditambahkan semakin besar (5% sampai 10%) dan kultur yang ditambahkan juga sudah dalam keadaan aktif, sehingga fase *lag* yang akan ditempuh semakin pendek. Dengan demikian, karena enzim ini dihasilkan pada saat fase *log* maka akan segera terlialisir. Menurut Aziz dan Sukara (1990) bahwa jumlah sel yang ditambahkan akan mempengaruhi fase yang akan terbentuk, disamping karakteristik metabolitnya. Hasil aktivitas inulinase dari isolate BAN-1 lebih 5 kali lipat dari *Zygosaccharomyces fermentatii* yang pernah diteliti oleh Wijanarka *et al.* (2002) dimana hanya mampu menghasilkan aktivitas sebesar 0,11 IU/ml.

Tabel 1. Optimasi konsentrasi starter (5%, 7,5% dan 10%) terhadap aktivitas inulinase isolat BAN – 1

Table 1. Optimization of Starter concentration (5%, 7,5% and 10%) on Isolate BAN-1 inulinase activity

Jenis isolat	Starter (%)	R1 (IU/ml)	R2 (IU/ml)	Rata-rata (IU/ml)
BAN - 1	5	0,322	0,322	0,322
	7,5	0,476	0,579	0,528
	10	0,613	0,515	0,582*

Dari hasil penelitian, diketahui bahwa isolat khamir BAN-1 (Gambar 1) penghasil inulinase yang diidentifikasi memiliki ciri-ciri morfologi dan biokimia seperti tercantum pada Tabel 2 dan Tabel 3.

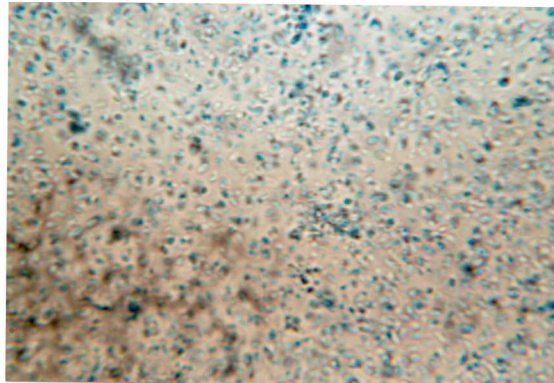
Tabel 2. Hasil Pengamatan Morfologi Khamir BAN-1
 Tabel 2. Morphological examination of BAN-1 yeast

Pengamatan	Keterangan
Bentuk sel (MEB)	Bulat sampai elips, sel terdapat dalam bentuk tunggal atau berpasangan atau dalam rantai pendek.
Ukuran sel (MEB)	P (2-4) x L (2-10) μm
Pertunasan (MEB)	Multipolar
Miselium palsu dan miselium sejati (Corn Meal Agar = CMA)	Membentuk <i>pseudomycelium</i> yang bercabang baik, tetapi tidak menghasilkan hifa sejati (<i>true mycelium</i>).
Penampakan koloni (Yeast extract Malt Agar = YMA)	Putih agak krem, permukaan halus, tekstur seperti mentega, kusam, tepi lurus tetapi menjadi bergerigi pada koloni tua, tengah koloni menggunung.
Penampakan koloni (Yeast extract Malt Broth = YMB)	Membentuk sedimen dan pelikel.
Spora seksual	Askospora berbentuk bulat. Askus tidak mudah pecah dan terlihat pada hari kedua pada YMB. Umumnya satu askospora dihasilkan dalam setiap askus. Ditemukan konjugasi antar sel.

Tabel 3. Uji Fisiologi/Biokimia Isolat 1
 Table 3. Physiological/biochemical Test for Isolate 1

UJI	ISOLAT 1
Fermentasi (Yeast Extract Peptone = YEP)	<i>Positif</i> : glukosa (w), galaktosa (w), sukrosa (w), melibiosa, rafinosa, trehalosa <i>Negatif</i> : maltosa, laktosa
Asimilasi C (Yeast Nitrogen Base = YNB)	<i>Positif</i> : Glucose, Galactose, L-Sorbose, Sucrose, Maltose, Melezitose, Inulin, Soluble starch, D-Xylose, L-Arabinose, D-Arabinose, D-Ribose, L-Rhamnose, Glycerol, Erythritol, Ribitol (Adonitol), Dulcitol (Galactitol), D-Mannitol, D-Glucitol (D-Sorbitol), α -Methyl-D-Glucoside, Glucono- δ -Lactone, 2-Ketogluconic Acid, 5-Ketogluconic Acid, Succinic Acid, Citric Acid, Inositol, N-acetyl-D-glucosamine <i>Negatif</i> : Cellobiose, Trehalose, Lactose, Mellibiose, Raffinose, Methanol, Ethanol, Salicin, D-L-Lactic Acid, D-Glucuronic Acid, D-Galacturonic Acid, Arbutin, Paraffin oil, D-glucosamine, Hexadecane.
Asimilasi N (Yeast Carbon Base = YCB)	<i>Positif</i> : amonium sulfat, kalium nitrat, natrium nitrit, L-Lysine, Cadaverine, Creatine <i>Negatif</i> : Ethylamine-HCl, Creatinine, D-Glucosamine, Imidazole, Tyrosine, Caseine, Hypoxanthine, N-acetyl-D-glucosamine.
Pembentukan enzim urease (Christensen's Urea Agar = CUA)	<i>Negatif</i>
Pertumbuhan pada suhu 27°C (Yeast extract Malt Agar = YMA)	<i>Positif</i>
Pertumbuhan pada suhu 37°C (Yeast extract Malt Agar = YMA)	<i>Negatif</i>
Pertumbuhan pada medium 60% sukrosa (Christensen's Urea Agar = YEPA)	<i>Positif</i>

Berdasarkan karakter morfologi dan hasil uji fisiologi/biokimia yang diamati disimpulkan bahwa khamir BAN-1 tersebut adalah *Pichia* sp1 (Gambar 1) E.C. Hansen emend. Kurtzman.



Gambar 1. Morfologi Isolat BAN-1 (perbesaran 400 x)
Figure 1. Isolate BAN-1 morphology (magnification 400x)

Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan konsentrasi starter yang terbaik adalah 10% dengan aktivitas enzim sebesar 0,582 IU. Sedangkan karakter morfologi dan hasil uji fisiologi/biokimia yang diamati disimpulkan bahwa isolat khamir BAN-1 adalah *Pichia* sp.

Ucapan Terimakasih

Penulis/ Peneliti mengucapkan banyak terima kasih kepada Program Insentif Riset Terapan-Menristek Tahun Anggaran 2007 yang telah mendanai sehingga dapat 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).
- _____ ; 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. Di 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*. 2 nd Edition. Cambridge Univ. Press. Cambridge
- Bajpai, P. and Margaritis A. 1987. Characterization of Moleculer Sieve-Bound Inulinase. *J. Ferment Technol.* 65 (2): 239 – 247.
- Bucke.C. 1988. *Enzymes in Fructose Manufacture*. Dalam. *Enzymes and food Processeing*. 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. Carbohydrat Analysis; A Practical Approach. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Cruegur, W. and Crueger A.. 1984. Biotechnology: A Texbook o Industrial Microbiology. Thomas (Ed) Sinauer Associated, Inc. Sunderland, M.A 01375.
- De Lenheer, L. and Hoebregs, H.. 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. Didalam Comprehensive Biotechnology. The Principles, Application and Regulation of Biotechnology in Industry, Agryculture and Medicine. Moo-Young, M (Ed) Pergamon Press.
- Javadekar, VS, Siva Raman H. 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, A and Kratochilova L.. 1990. Yeast and Yeast Like Organism. UCH. 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. Protoplas Fusion *In* 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 J.W. Foster, 1988. Microbial Physiology. John Wiley and Sons Inc., New York.
- Nagy I.Z., C. Palagyi, Vagvolgyi and L. Ferenczy. 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. 2001 (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 Vol. 29
- Pessoa A. and Vitolo M. 1999. Inulinase From *Kluyveromyces marxianus*: Culture Medium Composition and Enzyme Extraction. Journal Chemical Eng. Vol. 16.

- 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.
- _____ ; W.S. Ritmeester; W.A. Scheffer and J.P. van Dijken. 1990a. Localization of Inulinase and Invertase in *Kluyveromyces* sp.. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (11) : 3329 – 3336.
- _____ ; 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* 2001.
- , 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*, 2002.
- 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*, 2003.
- Wijanarka, Kusdiyantini E. dan Hermin P.S. 2004. Fusi Protoplas Interspesifik *Kluyveromyces marxianus* dan *Torulospira pretoriensis* Authotonus Untuk Produksi Enzim Inulinase Termotabil. *Penelitian Dasar*, 2004.
- 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*, 2005.
- Xiao, R., M. Tanida and S. Takao. 1998. Inulinase from *Cryosporium pannorum* J. *Ferment. Technol.* 66 (5) : 244 – 248
- _____ ; Tanida M. and Takao S. 1989. Purification and Some Properties of Endoinulinase from *Cryosporium pannorum* J. *Ferment. Bioeng* 67 (4): 244