

PRODUKSI INULINASE DAN KECEPATAN PERTUMBUHAN SPESIFIK ISOLAT KHAMIR DUCC Y-015 PADA BERBAGAI KONSENTRASI TEPUNG UMBI DAHLIA

Dani Ika Purwaningsih*, Arina Tri Lunggani*, Endang
Kusdiyantini*

Departemen Biologi, Fakultas Sains dan Matematika, Universitas Diponegoro,
Tembalang, Semarang 50275 Telepon (024) 7474754; Fax. (024) 76480690

ABSTRACT

Inulin is an abundant compound in the nature after starch. Hydrolytic enzyme called inulinase is able to catalyse hydrolysis reaction of inulin polysaccharides into fructose and fructooligosaccharide (FOS). Yeast isolate DUCC Y-015 is one of the microbes that is able to produce inulinase. The action of inulinase enzyme associated with the growth of the isolate. Specific growth rate is one of the measurement of growth parameters; it is defined as the increase in cell biomass per unit time in the growth phase of the microbes. This study aims to examine the inulinase production and specific growth rate of yeast isolate DUCC Y-015 on the medium with various concentrations of dahlia tuber flour. The measurement of growth was done by weighing the cell dry weight and inulinase activity test was done by calculating the reduction sugar using DNS method. The used concentrations of dahlia tuber flour in the medium were 2%, 3%, 4% and 5%. Inulinase activity in each treatment was 0,111 IU/ml, 0,147 IU/ml, 0,113 IU/ml and 0,119 IU/ml, respectively, whereas the specific growth rate was 0,0062 hour⁻¹, 0,0081 hour⁻¹, 0,0077 hour⁻¹, 0,0052 hour⁻¹, respectively. The results were tested using the Mann-Whitney Test and the Kruskal-Wallis Test. According to the results, the most optimum inulinase production and specific growth rate (μ) of yeast isolate DUCC Y-015 on dahlia tuber flour medium was treated with 3% concentration of dahlia tuber flour.

Keywords: Dahlia Tuber Flour, Yeast Isolate DUCC Y-015, Specific Growth Rate, Inulinase Activity

ABSTRAK

Inulin merupakan senyawa yang melimpah di alam setelah pati. Enzim hidrolitik yang mengkatalisis reaksi hidrolisis polisakarida inulin menjadi fruktosa dan fruktooligosakarida (FOS) adalah inulinase. Isolat khamir DUCC Y-015 merupakan salah satu mikroba yang mampu menghasilkan inulinase. Kerja enzim inulinase akan berkaitan dengan pertumbuhan mikroorganisme. Kerja enzim inulinase akan berkaitan dengan pertumbuhan mikroorganisme. Salah satu parameter pengukuran pertumbuhan adalah kecepatan pertumbuhan spesifik. Kecepatan pertumbuhan spesifik diartikan sebagai pertambahan biomassa sel per satuan waktu pada fase pertumbuhannya. Tujuan penelitian ini adalah mengkaji produksi inulinase serta kecepatan pertumbuhan spesifik isolat khamir DUCC Y-015 pada medium dengan berbagai konsentrasi tepung umbi dahlia. Pengukuran pertumbuhan dilakukan dengan mengukur berat kering sel dan uji aktivitas inulinase dilakukan dengan menghitung gula reduksi menggunakan metode DNS. Konsentrasi tepung umbi dahlia yang digunakan sebagai medium adalah sebesar 2%, 3%, 4% dan 5%. Aktivitas inulinase pada masing-masing perlakuan

berturut-turut 0,111 IU/ml, 0,147 IU/ml, 0,113 IU/ml dan 0,119 IU/ml, sedangkan kecepatan pertumbuhan spesifik berturut-turut sebesar 0,0062 jam⁻¹, 0,0081 jam⁻¹, 0,0077 jam⁻¹, 0,0052 jam⁻¹. Hasil penelitian diuji menggunakan Mann-Whitney Test serta Kruskal-Wallis Test. Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka produksi inulinase dan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) paling optimum yang dihasilkan isolat khamir DUCC Y-015 pada medium tepung umbi dahlia adalah pada perlakuan dengan konsentrasi tepung umbi dahlia 3%.

Kata kunci : Tepung Umbi Dahlia, Isolat Khamir DUCC Y-015, Kecepatan Pertumbuhan Spesifik, Aktivitas Inulinase

Pendahuluan

Inulin merupakan senyawa melimpah di alam setelah pati (Franck, 2003). Inulin merupakan senyawa yang potensial untuk dikembangkan. Potensi utama inulin adalah dapat dijadikan high fructose syrup (HFS) dan fructo-oligosaccharides (FOS) (Ricca et al., 2007; Yuan et al., 2006). HFS dan FOS merupakan senyawa yang penting pada produksi makanan, minuman dan farmasi (Tohamy, 2006). Inulin terdapat pada umbi tanaman dahlia, akar chicory dan umbi Jerusalem artichoke dalam jumlah besar (Franck, 2003). Inulin juga terdapat pada pisang, bawang perai, bawang merah, bawang putih dan gandum dalam jumlah sedikit (Oktavia, 2010).

Isolat khamir DUCC Y-015 merupakan salah satu mikroba yang mampu menghasilkan inulinase. Penelitian mengenai produksi inulinase isolat khamir DUCC Y-015 pada medium selain umbi dahlia telah dilakukan, namun penelitian mengenai produksi inulinase dan kecepatan pertumbuhan spesifik pada variasi konsentrasi tepung umbi dahlia belum dilakukan. Atas dasar di atas maka perlu dilakukan penelitian mengenai produksi inulinase dan kecepatan pertumbuhan spesifik oleh isolat khamir DUCC Y-015 pada variasi konsentrasi tepung umbi dahlia.

Tujuan penelitian ini adalah mengkaji produksi inulinase serta kecepatan pertumbuhan spesifik isolat khamir DUCC Y-015 yang optimal pada medium dengan variasi konsentrasi tepung umbi dahlia.

Memberikan pengetahuan mengenai produksi inulinase serta kecepatan pertumbuhan spesifik isolat khamir yang dapat digunakan sebagai acuan untuk optimasi produksi inulinase oleh isolat khamir DUCC Y-015 dengan adanya variasi konsentrasi tepung umbi dahlia.

Metode

Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Matematika Universitas Diponegoro pada bulan Februari-Juli 2013.

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan terdiri atas alat-alat yang digunakan di laboratorium mikrobiologi.

Bahan yang digunakan terdiri atas biakan murni isolat khamir DUCC Y-015 (koleksi Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi FSM Universitas Diponegoro), inulin murni 1%, NH₄NO₃ 0,23%, (NH₄)₂ HPO₄ 0,37%, K₂HPO₄ 0,1%. MgSO₄ 7H₂O 0,05%, yeast ekstrak 0,15% dan tepung umbi dahlia (sebagai sumber inulin). Bahan lain meliputi agar,

reagen DNS, BSA, sukrosa 1 %, alkohol, buffer sodium asetat dan akuades.

Cara Kerja Penelitian

a. Pembuatan Tepung Umbi Dahlia (Ertan et al., 2003)

Umbi dahlia segar yang berumur 10 bulan dikupas, dicuci, dan diiris tipis, kemudian dikeringkan dalam oven bersuhu 80°C selama ± 2 jam. Umbi dahlia kering diblender sampai menjadi tepung lalu disaring menggunakan ayakan dengan diameter 120 mesh.

b. Pembuatan Medium Produksi Inulinase

Tepung umbi dahlia sebanyak 2 gr (P1) dilarutkan dalam 100 ml aquades (untuk konsentrasi tepung umbi dahlia 2 %), dipanaskan, lalu disaring kemudian filtrat yang diperoleh ditambah dengan 0,37% (NH₄)₂HPO₄; 0,05% MgSO₄.7H₂O; 0,23% NH₄NO₃; 0,1% K₂HPO₄; dan yeast extract, kemudian dilakukan pengecekan pH. Medium disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 2 atm selama 20 menit, untuk konsentrasi tepung umbi dahlia 3% dilarutkan sebanyak 3 g (P2), untuk konsentrasi 4% dilarutkan sebanyak 4 g (P3), dan untuk konsentrasi 5% dilarutkan sebanyak 5 g (P4).

c. Peremajaan Isolat Khamir DUC Y-015

d. Pembuatan Starter Isolat khamir DUC Y-015

Kultur pada agar miring berumur 3 hari diambil 1 ose dan diinokulasikan dalam 100 ml medium produksi enzim dengan pH 5 dan diagitasi pada kecepatan 120 rpm selama 22 jam dengan jumlah 10⁷ sel/ml.

e. Produksi Inulinase

Starter diambil sebanyak 10 % (v/v) dan diinokulasikan pada 50 ml masing-masing medium perlakuan dengan berbagai konsentrasi umbi dahlia dengan konsentrasi (2%, 3%, 4% dan

5%) dan pH medium (5) kemudian diagitasi dengan rotary shaker berkecepatan 120 rpm pada suhu ruang. Perlakuan ini diulang sebanyak 3 kali. Pengukuran enzim dilakukan setiap interval waktu 6 jam.

Pemisahan inulinase dilakukan dengan cara, kultur sebanyak 1,5 ml dimasukkan dalam tabung eppendorf dan disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 15 menit.

f. Pengukuran Aktivitas Inulinase (Xiao et al., 1988; Ertan et al., 2003)

Pengukuran Aktivitas inulinase dianalisis dengan metode gula reduksi DNS (Chaplin & Kennedy, 1994). Gula reduksi diukur dengan cara menghitung absorbansi enzim substrat (ES) dikurangi dengan absorbansi substrat (S) dan enzim (E), sehingga diperoleh rumus sebagai berikut:

$$\text{Aktivitas Enzim (IU)} = \frac{(\text{AbsES} - \text{AbsE} - \text{AbsS}) \cdot \text{Fruktosa}}{\text{BMf} \cdot 30'} \times P \times 1000$$

Abs ES = absorbansi enzim substrat

Abs E = absorbansi enzim

Abs S = absorbansi substrat

BMf = berat molekul fruktosa (180,1)

P = faktor pengenceran (5)

30' = 30 menit

Fruktosa = persamaan regresi kurva fruktosa standar

$$Y = -0,0288 + 0,5398X$$

Aktivitas enzim inulinase diuji menggunakan prosedur berikut : reaksi enzim-substrat (ES) yang berisi 0,5 ml inulin murni; 0,4 ml buffer sodium asetat; 0,1 ml crude enzim, reaksi substrat (S) berisi 0,5 ml inulin murni; 0,4 ml buffer sodium asetat; 0,1 ml aquades, dan reaksi enzim (E) yang berisi 0,4 ml buffer sodium asetat; 0,1 ml crude enzim; 0,5 ml aquades.

Setiap reaksi (ES, S, E) dari tiap umur kultur diinkubasi pada suhu 50°C selama 30 menit. Tiap tabung sampel dimasukkan dalam air mendidih

selama 5 menit untuk menghentikan reaksi enzim yang terjadi. Setelah dingin ditambahkan reagen DNS sebanyak 1 ml dan dididihkan kembali selama 10 menit. Adanya gula pereduksi ditandai dengan perubahan warna larutan menjadi merah. Selanjutnya setiap tabung reaksi (ES, S, E) ditambahkan 5 ml aquades untuk diukur kerapatan optisnya dengan spektrofotometer (λ_{570} nm) (Chaplin & Kennedy, 1994).

g. Aktivitas Invertase

Aktivitas invertase juga dianalisis dengan metode gula reduksi DNS (Chaplin & Kennedy, 1994). Metode yang digunakan sama dengan pengukuran aktivitas inulinase, perbedaannya terdapat pada substrat. Aktivitas invertase diukur menggunakan substrat larutan sukrosa 1%.

h. Pengukuran Berat Kering Sel Biomassa diukur berdasarkan berat sel kering menggunakan metode Scragg (1991). Berat kering sel (x) dapat dihitung sebagai berikut.

$$X \text{ (g/l)} = \frac{\text{Berat tabung berisi sel kering (g)} - \text{berat tabung kosong (g)}}{\text{Volume sampel (ml)}} \times 10^3$$

Nilai berat kering digunakan untuk perhitungan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ). Rumus perhitungan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) menurut Fatmawati (2009) adalah sebagai berikut :

$$\mu = \frac{\ln X_{t_2} - \ln X_{t_1}}{t_2 - t_1}$$

Keterangan :

μ : kecepatan pertumbuhan spesifik (Jam⁻¹)

X_{t_1} : berat kering pada waktu t_1

X_{t_2} : berat kering pada waktu t_2

t_1 : waktu jam ke-1 awal fase logaritmik

t_2 : waktu jam ke-2 akhir fase logaritmik

i. Pengujian Kadar Protein dengan Metode Lowry (Deutscher, 1990)

Supernatan yang didapatkan diambil 1 ml dan ditambah dengan 5 ml larutan Lowry B kemudian dihomogenkan.

Larutan digojok dan dibiarkan selama 10 menit. Kemudian ditambah 0,5 ml larutan Lowry A digojok dan dibiarkan selama 20 menit. Selanjutnya diukur absorbansinya pada 600 nm. Kadar protein ditentukan berdasarkan kurva BSA standar.

Analisis Data

Metode penelitian ini dilakukan secara eksperimental, sehingga digunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan P_1 (tepung umbi dahlia 2%), P_2 (tepung umbi dahlia 3%), P_3 (tepung umbi dahlia 4%) dan P_4 (tepung umbi dahlia 5%). Waktu inkubasi yang diambil adalah 6 jam, 12 jam, 18 jam, 24 jam, 30 jam, 36 jam, 42 jam, dan 48 jam. Pengulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk masing – masing perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA. Jika terdapat beda nyata dari data yang diperoleh, maka dilanjutkan dengan uji lanjut.

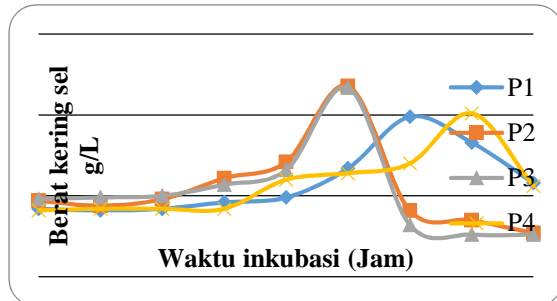
Hasil Dan Pembahasan

Produksi inulinase isolat khamir DUCC Y-015 dilakukan dengan menggunakan medium berbasis Tepung Umbi Dahlia (TUD). TUD ditimbang kemudian dibuat medium dengan konsentrasi 2% (P_1), 3% (P_2), 4% (P_3) dan 5% (P_4). Pengamatan dilakukan setiap 6 jam sekali selama 48 jam. Hasil penelitian tersebut sebagai berikut :

4.1. Pertumbuhan Isolat Khamir DUCC Y-015

Pertumbuhan isolat khamir DUCC Y-015 dihitung berdasarkan berat kering sel. Pertumbuhan isolat khamir DUCC Y-015 pada medium P_1 terlihat lambat hingga jam ke- 18 (Gambar 4.1). Pertumbuhan terlihat mulai cepat setelah jam ke- 18 sebesar 44,6 g/L. Pertumbuhan tertinggi diperoleh pada jam ke- 36 dengan berat kering sel sebesar 49,9 g/L. Berdasarkan

pertumbuhan ini diperoleh nilai kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) sebesar $0,0062 \text{ jam}^{-1}$ (Tabel 4.1).



Gambar 4.1. Pertumbuhan isolat khamir Ducc Y-015 pada medium dengan konsentrasi TUD yang berbeda.

Hasil pertumbuhan perlakuan P2 menunjukkan, bahwa isolat khamir Ducc Y-015 pertumbuhannya masih lambat jam ke- 12. Pertumbuhan yang cepat pada medium P2 ini berlangsung selama 18 jam (Tabel 4.1). Berat kering sel pada jam ke- 12 sebesar $44,8 \text{ g/L}$ dan pada jam ke- 30 berat kering sel sebesar $51,8 \text{ g/L}$. Nilai kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) pada jam ke- 12 hingga jam ke- 30 sebesar $0,0081 \text{ jam}^{-1}$ (Tabel 4.1).

Perlakuan P3 menunjukkan pertumbuhan isolat khamir Ducc Y-015 masih lambat hingga jam ke- 12, kemudian terlihat cepat hingga jam ke- 30. Berat kering sel pada jam ke- 12 adalah sebesar $45,0 \text{ g/L}$, sedangkan pada jam ke- 30 sebesar $51,7 \text{ g/L}$. Nilai kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) pada jam ke-12 hingga jam ke- 30 sebesar $0,0077 \text{ jam}^{-1}$ (Tabel 4.1). Pertumbuhan yang cepat dari isolat khamir Ducc Y-015 pada perlakuan P3 berlangsung selama 18 jam. Pertumbuhan isolat khamir Ducc Y-015 pada perlakuan P4 menunjukkan pertumbuhan yang lambat berlangsung hingga jam ke- 18 dengan berat kering sel sebesar $44,2 \text{ g/L}$, pada jam ini pertumbuhan mulai cepat yang berlangsung hingga jam ke- 42. Berat

kering sel jam ke- 42 sebesar $50,1 \text{ g/L}$, sehingga kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) sebesar $0,0052 \text{ jam}^{-1}$ (Tabel 4.1).

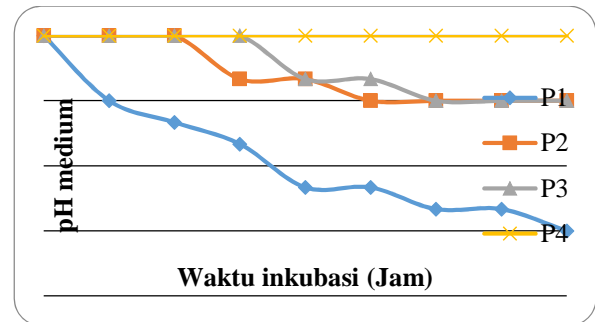
Tabel. 4.1. Nilai kecepatan pertumbuhan spesifik (μ)

Perlakuan	Berat Kering sel t_1-t_2 (g/L)	Jam	μ (jam^{-1})
P1	44,6 - 49,9	18 - 36	0,0062
P2	44,8 - 51,8	12 - 30	0,0081
P3	45,0 - 51,7	12 - 30	0,0077
P4	44,2 - 50,1	18 - 42	0,0052

Isolat khamir Ducc Y-015 memiliki kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) tertinggi pada medium P2, sedangkan yang paling rendah adalah pada medium P4. Hal ini karena pada konsentrasi medium P2 sebesar 3% merupakan konsentrasi TUD yang optimal untuk pertumbuhan isolat khamir Ducc Y-015 pada medium TUD. Perlakuan P3 memiliki nilai kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) yang tidak berbeda jauh dengan P2, pada perlakuan ini konsentrasi TUD adalah sebesar 4%. Ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 4%, isolat khamir Ducc Y-015 masih dapat tumbuh cukup optimal. Perlakuan P4 dan P1 memiliki μ lebih rendah dibandingkan dengan perlakuan P2 dan P3. Pertumbuhan isolat khamir Ducc Y-015 pada perlakuan P1 dan P4 lebih lambat dibandingkan P2 dan P3. Ini menunjukkan pada perlakuan P1 dan P4 pertumbuhan isolat khamir Ducc Y-015 tidak optimal.

Hasil pengukuran pH medium menunjukkan bahwa perlakuan P1 mengalami penurunan yang cukup signifikan hingga akhir pengamatan (Gambar 4.2). Perlakuan P2 dan P3 mengalami penurunan yang hampir sama, hanya saja pada P2 penurunan dimulai pada jam ke- 18 dan berlangsung terus hingga akhir pengamatan. Perlakuan P3 mengalami penurunan pH dimulai pada jam ke- 24 dan berlangsung terus hingga akhir pengamatan. Perlakuan P4 tidak mengalami penurunan pH dari awal pengamatan hingga akhir.

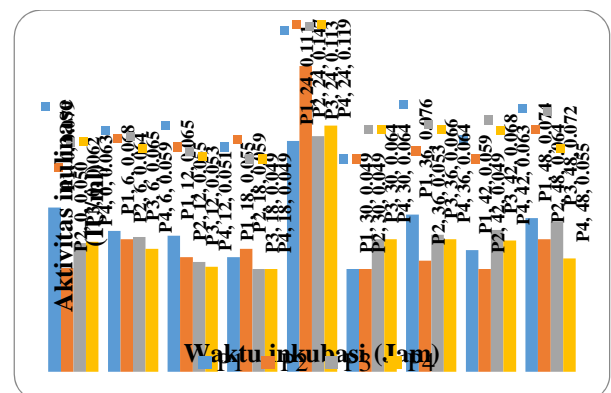
Menurut Yuliana (2008) semakin tinggi berat kering sel, maka nilai pH cenderung menurun terutama pada saat fase logaritmik. Penurunan pH yang terjadi adalah karena terbentuknya produk dan penambahan sel sehingga medium semakin asam. Produk tersebut diantaranya adalah asam laktat dan alkohol. Menurut Suprihatin (2010) perubahan pH dapat terjadi selama fermentasi karena H dilepaskan selama konsumsi NH_4^+ dan dikonsumsi selama metabolisme NO_3^- dan penggunaan asam amino sebagai sumber karbon. pH medium P4 tidak mengalami perubahan, hal ini disebabkan karena pertumbuhan tidak terlalu cepat yang menyebabkan produk yang terbentuk tidak terlalu tinggi sehingga pH medium masih bertahan hingga akhir pengamatan. Perlakuan P1 menunjukkan penurunan pH hingga pH 3,5. Penurunan pH pada perlakuan ini dimungkinkan pembentukan produk asam lebih tinggi dibandingkan perlakuan yang lain.



Gambar 4.2. Nilai pH Medium Pertumbuhan Isolat Khamir DUCC Y-015

4.2. Aktivitas Inulinase

Aktivitas inulinase isolat khamir DUCC Y-015 dilakukan menggunakan metode gula reduksi (DNS). Temperatur yang digunakan pada uji aktivitas inulinase ini adalah 50°C , dengan pH 5. Menurut Nakamura dan Nakatsu dalam Hartiko (2005) temperatur rata-rata untuk aktivitas inulinase berkisar antara $45-50^\circ\text{C}$ dan optimum pada temperatur 50°C . Aktivitas inulinase cenderung terjadi pada pH asam yaitu berkisar 4-5. Hasil pengukuran aktivitas inulinase menunjukkan pada perlakuan P1 aktivitas inulinase tertinggi dicapai pada jam ke- 24 dengan aktivitas sebesar 0,111 IU/ml, dan pada jam ke-0 aktivitas inulinase juga menunjukkan nilai yang tinggi dengan aktivitas sebesar 0,079 IU/ml (Gambar 4.3).



Gambar 4.3. Aktivitas inulinase isolat khamir DUCC Y-015.

Perlakuan P2, P3 dan P4 menunjukkan aktivitas inulinase tertinggi terjadi pada jam ke-24 dengan nilai aktivitas inulinase berturut-turut adalah 0,147 IU/ml, 0,113 IU/ml dan 0,119 IU/ml. Isolat khamir DUCC Y-015 pada jam ke- 24 mengalami pertumbuhan yang cepat, sehingga nilai aktivitas inulinase lebih tinggi dibandingkan dengan waktu yang lain. Namun, pada medium P1 terlihat ada aktivitas enzim cukup tinggi pada jam ke- 0, ini menunjukkan aktivitas inulinase pada P1 dimulai pada jam ke- 0 kemudian menurun hingga jam ke- 18 dan optimum pada jam ke- 24. Pertumbuhan pada jam ke- 24 menunjukkan adanya pertumbuhan yang dipercepat. Aktivitas inulinase tertinggi berada pada perlakuan P2, pada pengukuran pertumbuhan, kecepatan pertumbuhan spesifik tertinggi juga berada pada perlakuan P2.

Aktivitas enzim akan menurun setelah pertumbuhan sel yang cepat berakhir dan kecepatan pertumbuhan melambat kembali, menurut Hartiko (2005) semakin lama waktu inkubasi semakin besar jumlah gula reduksi sebagai hasil hidrolisis inulin, gula reduksi ini merupakan katabolit yang menghambat aktivitas inulinase jika dalam jumlah yang besar.

Hasil pengujian laboratorium mengenai kandungan inulin dalam TUD menunjukkan inulin yang terdapat pada tepung umbi dahlia sebelum dibuat medium adalah 43,20% (Lampiran 7) dalam 100 g tepung. Kandungan inulin saat sudah dijadikan medium menurun hingga 5,72% dalam 100 g tepung. Hal ini disebabkan ketika TUD dijadikan medium dan mengalami proses sterilisasi, inulin terpecah karena adanya pemanasan menjadi fruktosa dan glukosa. Hal ini juga merupakan salah satu faktor yang menyebabkan aktivitas inulinase isolat

khamir DUCC Y-015 rendah. Khamir ini akan menggunakan glukosa dan fruktosa terlebih dahulu untuk pertumbuhan.

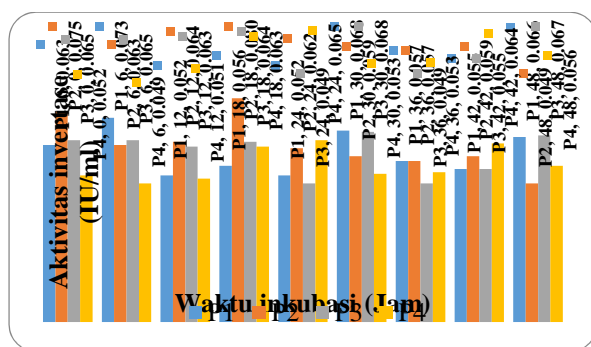
Hasil data pertumbuhan yang menunjukkan kecepatan pertumbuhan spesifik yang rendah menunjukkan bahwa pertumbuhan berjalan lambat, pertumbuhan yang lambat menghasilkan sel sedikit sehingga aktivitas inulinase rendah.

4.3. Aktivitas Invertase

Pengukuran aktivitas invertase isolat khamir DUCC Y-015 dilakukan dengan metode gula reduksi (DNS). Pengukuran aktivitas invertase ini digunakan untuk mengetahui ada atau tidaknya hidrolisis sukrosa pada medium. Menurut Niness (1999) sukrosa merupakan disakarida yang tersusun dari unit glukosa dan fruktosa. Terdapat unit glukosa di ujung rantai inulin dengan ikatan (1-2) dengan monomer fruktosa, sehingga apabila ujung tersebut dihidrolisis akan membentuk sukrosa. Aktivitas invertase dapat dilihat pada Gambar 4.4. Hasil uji laboratorium mengenai kandungan sukrosa dalam tepung umbi dahlia menunjukkan, dalam 100 g tepung umbi dahlia mengandung 2,40 % sukrosa (Lampiran 5), sedangkan setelah menjadi medium kandungannya menurun menjadi 0,84 %. Hal ini yang menyebabkan adanya aktivitas invertase di setiap pengamatan.

Pengukuran aktifitas invertase dilakukan untuk menghitung aktivitas katalitik inulinase. Hasil pengukuran menunjukkan, perlakuan medium P1 nilai aktivitas invertase tertinggi terjadi pada jam ke- 6 yaitu sebesar 0,073 IU/ml. Perlakuan P2 aktivitas invertase tertinggi terjadi pada jam ke- 18 dengan aktivitas sebesar 0,080 IU/ml. Aktivitas tertinggi pada perlakuan P3 berada pada jam ke- 30 dengan

aktivitas sebesar 0,068 IU/ml, dan P4 aktivitas tertinggi terjadi di jam ke- 24 dengan aktivitas sebesar 0,065 IU/ml. Aktivitas invertase yang terukur pada semua perlakuan rendah. Hal ini disebabkan karena keberadaan sukrosa pada setiap waktu pengamatan, hanya saja konsentrasinya rendah. Sukrosa pada medium pertumbuhan hanya sebesar 0,84% dalam setiap 100 g medium.



Gambar 4.4. Aktivitas Invertase Isolat Khamir DUC Y-015.

Perlakuan P2 menunjukkan aktivitas invertase tinggi pada jam ke-18. Aktivitas invertase pada perlakuan P2 cenderung tinggi hingga jam ke-18, hal ini karena adanya kandungan sukrosa dalam medium. Puncak dari aktivitas invertase berada pada jam ke-18. Perlakuan P2 jam ke-18 menunjukkan pertumbuhan yang mulai cepat, sehingga isolat khamir DUC Y-015 menghasilkan invertase yang akan memecah sukrosa untuk mendukung pertumbuhannya. Perlakuan P3 menunjukkan aktivitas invertase tertinggi pada jam ke-30, hal ini dikarenakan pada jam ke-24 aktivitas inulinase P3 tinggi, sehingga konsentrasi sukrosa dalam medium meningkat. Perlakuan P4 menunjukkan aktivitas tertinggi terjadi di jam ke-24, hal ini dikarenakan pada jam ini pertumbuhan khamir mulai meningkat dibandingkan pada jam lainnya.

Menurut Rosa (2010) konsentrasi substrat merupakan faktor yang mempengaruhi kerja enzim, dimana substrat akan membentuk kompleks dengan enzim sebelum melepaskan diri kembali membentuk enzim dan produk. Hasil ini menunjukkan bahwa isolat khamir DUC Y-015 mampu menghasilkan enzim invertase. Menurut Skowronck et al. dalam Wijanarka (2007), invertase merupakan enzim hidrolase yang memecah sukrosa pada bagian ujung rantai inulin menjadi glukosa dan fruktosa. Enzim ini bekerja bersama-sama dengan inulin. Pernyataan ini sesuai dengan hasil penelitian bahwa selain menghasilkan inulinase, isolat khamir DUC Y-015 juga menghasilkan invertase. Hasil uji statistik menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan tidak menunjukkan beda yang signifikan, sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan konsentrasi substrat tidak berpengaruh terhadap aktivitas invertase.

4.4. Kadar Protein

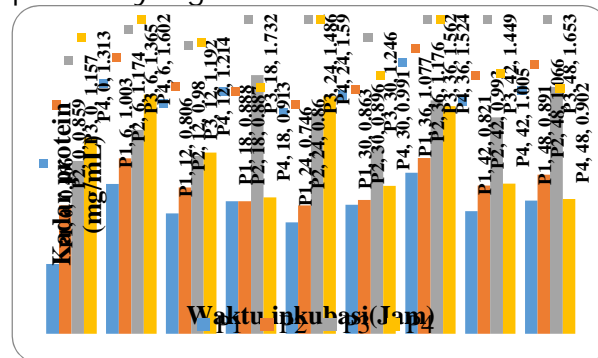
Pengukuran kadar protein medium pertumbuhan isolat khamir DUC Y-015 dilakukan dengan metode Lowry. Pengukuran ini dilakukan untuk mengetahui kadar protein yang terlarut pada media dan menghitung aktivitas spesifik enzim. Menurut Budiman (2009) protein yang terlarut dalam media fermentasi perlu diukur untuk menghitung aktivitas spesifik enzim. Hasil pengukuran kadar protein menunjukkan pada perlakuan P1, P2 dan P3 kadar protein di awal pengamatan lebih rendah dibandingkan di akhir pengamatan. Peningkatan kadar protein ini disebabkan adanya enzim yang bekerja, enzim merupakan protein. Kadar enzim yang tinggi akan meningkatkan kadar protein yang terlarut dalam medium. Kadar protein

isolat khamir DUCC Y-015 disajikan pada Gambar 4.5.

Perlakuan P4 kadar protein di awal pengamatan lebih besar dibandingkan di akhir pengamatan. Hal ini dikarenakan kandungan protein medium berkurang dan aktivitas enzim tidak tinggi di akhir pengamatan. Ini yang menyebabkan kadar protein medium lebih rendah di akhir pengamatan. Kadar protein pada jam ke- 6, untuk semua perlakuan mengalami peningkatan, hal ini dikarenakan mulai adanya aktivitas enzim baik invertase maupun inulinase. Kadar protein juga dipengaruhi oleh konsentrasi substrat. Kadar protein pada jam ke- 6 tinggi sesuai tingginya dengan konsentrasi TUD dalam medium. Jam ke- 12 menunjukkan kadar protein menurun, hal ini disebabkan pada semua perlakuan aktivitas enzim juga menurun.

Perlakuan P3 jam ke 18 menunjukkan kadar protein yang tinggi dibandingkan perlakuan lain. Tingginya kadar protein ini dimungkinkan karena adanya aktivitas enzim invertase yang cukup tinggi dan adanya kadar protein dalam medium. Konsentrasi medium yang tinggi yaitu 4% serta pertumbuhan yang mulai meningkat akan menghasilkan enzim yang cukup tinggi untuk mendegradasi substrat. Perlakuan P3 menunjukkan kadar protein yang cukup tinggi dari jam ke-18 hingga akhir pengamatan. Hal ini karena perlakuan P3 menunjukkan pertumbuhan yang cukup tinggi, sehingga enzim yang dihasilkan juga tinggi. Kadar protein dipengaruhi oleh konsentrasi substrat dan metabolit yang terlarut dalam medium. Adanya perbedaan diantara ketiga faktor tersebut akan mempengaruhi kadar

protein yang terlarut dalam medium.



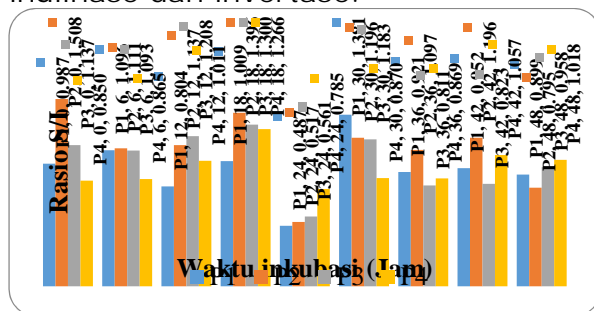
Gambar 4.5. Nilai kadar protein medium pertumbuhan isolat khamir DUCC Y-015.

Perlakuan P1 dan P2 menunjukkan perubahan kadar protein yang tidak begitu berarti, hal ini kemungkinan karena konsentrasi TUD yang digunakan lebih rendah yaitu sebesar 2% dan 3%. Perlakuan P3 dan P4 menunjukkan adanya perubahan pada setiap jam pengamatan. Perubahan ini dikarenakan adanya enzim yang diproduksi oleh Isolat Khamir DUCC Y-015 serta konsentrasi TUD yang cukup tinggi yaitu sebesar 4% dan 5%.

Menurut Budiman (2009) bahwa protein terlarut yang terukur tidak mutlak semuanya adalah enzim yang disintesis oleh mikroorganisme, karena di dalam media juga mengandung protein terlarut berupa sisa media (yeast ekstrak) atau hasil metabolisme protein mikroorganisme yang disekresikan. Menurut IPTEK (2005), dalam umbi dahlia mengandung kadar protein rata-rata sebesar 8,9 %. Selain dari konsentrasi medium, kadar protein juga dipengaruhi oleh enzim yang disekresikan. Hasil uji statistik terhadap kadar protein menunjukkan bahwa ada beda yang signifikan dari masing-masing perlakuan, ini berarti bahwa beda konsentrasi berpengaruh terhadap kadar protein terlarut dalam medium.

4.5. Aktivitas Katalitik Inulinase

Aktivitas katalitik dapat dilihat berdasarkan rasio S/I, dimana S merupakan aktivitas invertase dan I merupakan aktivitas inulinase. Rasio S/I tertinggi berada pada perlakuan P2 di jam ke- 0 yaitu sebesar 1,508. Gambar 4.6 menunjukkan pada jam ke- 24 rasio S/I pada semua perlakuan memiliki nilai paling rendah dibanding pada jam lain. Rasio S/I terendah terjadi pada perlakuan P1 di jam ke- 24 dengan nilai sebesar 0,487, kemudian P2 dengan nilai sebesar 0,517, P3 dengan nilai sebesar 0,561 dan P4 dengan nilai 0,785. Besar kecilnya rasio S/I tergantung pada konsentrasi inulinase dan invertase.



Gambar 4.6. Aktivitas katalitik inulinase isolat khamir DUC Y-015 berdasarkan rasio S/I.

Apabila rasio S/I rendah maka aktivitas inulinase tinggi, sedangkan aktivitas invertase rendah. Rasio S/I yang rendah menunjukkan tingkat keaktifan inulinase yang tinggi (Rouwenhorst et al., 1990 dalam Wijanarka, 2007). Rasio S/I dapat dilihat pada gambar 4.5.

Rasio S/I kurang dari 100 menunjukkan bahwa yang bekerja adalah inulinase. Menurut Sadikin dalam Wijanarka (2007), aktivitas katalitik merupakan aktivitas bagian khusus dari molekul enzim (situs katalitik) yang berfungsi untuk mengenali, mengikat dan mengolah substrat secara spesifik. Hasil uji statistik menunjukkan tidak terdapat beda signifikan dari masing-masing

perlakuan. Hal ini berarti perbedaan konsentrasi substrat tidak berpengaruh nyata terhadap aktivitas katalitik mikroba.

4.6. Aktivitas Spesifik Inulinase

Aktivitas spesifik diperoleh dari hasil bagi antara aktivitas inulinase dengan kadar protein. Hasil perhitungan menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi ditunjukkan pada jam ke- 0 untuk perlakuan P1 dengan aktivitas sebesar 2,433 IU/mg. Aktivitas spesifik tertinggi pada perlakuan P2, P3 dan P4 terjadi pada jam ke- 24 dengan besar aktivitas spesifik berturut-turut adalah 0,169 IU/mg; 0,080 IU/mg dan 0,076 IU/mg (Tabel 4.7).

Aktivitas spesifik merupakan jumlah unit enzim per miligram protein. Aktivitas spesifik inulinase ini berhubungan dengan kemurnian enzim inulinase dalam medium. Aktivitas spesifik yang tinggi menunjukkan protein enzim dalam medium juga tinggi. Aktivitas spesifik inulinase tertinggi terdapat pada perlakuan P1 pada jam ke- 0. Hal ini disebabkan karena pada saat itu aktivitas inulinase tinggi, sedangkan kandungan protein dalam medium rendah. Kandungan protein ini dipengaruhi oleh berat kering sel dan konsentrasi TUD. Tabel 4.2. Aktivitas spesifik inulinase isolat khamir DUC Y-015.

Aktivitas Spesifik Inulinase				
Waktu	P1	P2	P3	P4
0	2,433	0,061	0,058	0,049
6	0,067	0,054	0,052	0,037
12	0,088	0,057	0,053	0,047
18	0,062	0,070	0,029	0,056
24	0,149	0,169	0,080	0,076
30	0,058	0,056	0,058	0,069
36	0,082	0,045	0,042	0,048
42	0,074	0,061	0,048	0,066
48	0,083	0,060	0,044	0,078

Perlakuan P2, P3 dan P4 menunjukkan aktivitas spesifik tertinggi pada jam ke- 24. Namun, aktivitas spesifik inulinase pada ketiga perlakuan tersebut tidak lebih tinggi dari perlakuan P1. Hal ini disebabkan pada saat jam ke- 24 kadar protein terlarut dalam medium lebih banyak. Kadar protein terlarut dalam medium pada jam ke- 0, lebih dipengaruhi oleh konsentrasi TUD dalam medium, sedangkan pada jam ke- 24 kadar protein yang terukur lebih tinggi dibandingkan pada jam ke- 0. Hasil uji statistik menggunakan Mann-Whitney menunjukkan ada beda yang signifikan antara perlakuan P1 dengan semua perlakuan dan P3 dengan P4. Uji statistik menggunakan Kruskal Wallis menunjukkan ada beda yang signifikan antar masing-masing perlakuan.

Kesimpulan

Aktivitas inulinase isolat khamir DUCY Y-015 pada variasi konsentrasi TUD tertinggi terjadi pada perlakuan konsentrasi 3% dengan aktivitas sebesar 0,147 IU/ml. Kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) tertinggi terjadi pada perlakuan konsentrasi 3% yaitu sebesar 0,0081 jam⁻¹. Berdasarkan hasil yang diperoleh, maka produksi inulinase dan kecepatan pertumbuhan spesifik (μ) optimum yang dihasilkan isolat khamir DUCY Y-015 pada medium tepung umbi dahlia adalah pada perlakuan dengan konsentrasi tepung umbi dahlia 3%.

Daftar Pustaka

- Budiman, A. & Sigit, S. 2009. Pengaruh konsentrasi substrat, lama inkubasi dan pH dalam proses isolasi enzim xylanase dengan menggunakan media jerami padi. FT Kimia Undip. Semarang.
- Chaplin, M.F & J.F. Kennedy. 1994. Carbohydrat Analysis; A Practical Approach. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford.
- Deutscher, M. 1990. Guide To Protein Purification. Methods In Enzymology. Vol. 182. Academic Press. Inc. Boston. Toronto. Tokyo.
- Ertan, F., T. Aktac, A. C. Kaboglu, F. Ekinci & E. Bakar. 2003. Determination of Optimum Cultivation Conditions on The Production of Inulinase from *Rhizoctonia solani*. Pak. Journal Of Biosci. 6 (16): 1386-1388.
- Fatmawati, A. 2009. Model Kinetika Inhibisi Substrat pada Pertumbuhan *Kluyveromyces lactis*. Jurnal Teknik Kimia Indonesia. Vol. 8. No. 2. Hal: 50-55.
- Franck, A. & Leenheer Leen De. 2003. "Inulin". Email: ann.franck@orafti.com .Diakses 27 Agustus 2013.
- Hartiko, H. & S.L. Arum Sari. 2005. Aktivitas Inulinase Jamur yang Diisolasi dari Tanah Sekitar Umbi Dahlia (*Dahlia pinnata Cav.*). Biosmart. Vol 7. No. 1. Hal: 1-5.
- Niness, Kathy R. 1999. Inulin and oligofructosa: what are they. Journal of Nutrition. 1999;129: 1402S-1406S.
- Oktavia, B., Yustini Ma'aruf & Minda Azhar. 2010. Penentuan Kadar RBB pada Dye-Inulin secara HPLC Melalui Pembentukan Senyawa Dye-Inulin. Laporan Penelitian. FMIPA. Universitas Padang.
- Ricca, E. Calabro, V. Curcio, & S. Iorio, G. 2007. The state of the art in the production of fructose from inulin enzymatic hydrolysis. Critical Reviews in Biotechnology. Jul-sep 2007 129-145.
- Rosa, S.P. & Elok Nur Isro'ul Hasanah. 2010. Karakteristik Ekstrak Kasar Enzim Invertase yang

- Diamobilisasi dengan Na-Alginat. Prosiding Kimia FMIPA. ITS.
- Scragg, A.H. 1991. Bioreactors in Biotechnology, A Practical Approach. Ellis Horwood, NewYork.
- Sudarmadji, S., Haryono, & Suhardi. 1984. Prosedur Analisis Untuk Bahan Makanan dan Pertanian. Edisi ketiga. Liberty. Yogyakarta. 138 hlm.
- Suprihatin. 2010. Teknologi Fermentasi. UNESA University Press. Surabaya.
- Tohamy, EY. 2006. Purification and characterization of exoinulinase enzyme from *Sterptomyces grisenus*. Pakistan Journal of Biological Sciences 9(5):911-916.
- Wijanarka. Endang Sutariningsih. Kumala Dewi & Ari Indrianto. 2011. Respon Pertumbuhan *Pichia manshurica* dan *Rhodospordium paludigenum* pada berbagai media basal sebagai penentu untuk proses isolasi protoplas. Seminar Nasional IX Pendidikan Biologi FKIP UNS.
- Wijanarka & Sri Pujiyanto. 2002. Optimasi Produksi Enzim Inulinase Termotabi oleh Bakteri Termofilik Dari Umbi Dahlia (*Dahlia variabilis*). Jurnal Universitas Diponegoro. Semarang.
- Xiao, R., M. Tanida, & S. Takao. 1988a. Inulinase from *Chrisosporium pannorum*. Journal of Fermentation Technology 66 (5): 553-558.
- Yuliana, Neti. 2008. Kinetika pertumbuhan bakteri asam laktat isolat T5 yang berasal dari Tempoyak. Jurnal Teknologi Industri dan Hasil Pertanian. Vol. 13.